

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ İŞLENMİŞ SOYA ÜRÜNLERİNDE KALİTATİF VE KANTİTATİF GDO TANISI VE TRANSGEN ANALİZİ

Münevver Merve YILMAZ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Şule ARI

Mayıs, 2012

İSTANBUL



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ İŞLENMİŞ SOYA ÜRÜNLERİNDE KALİTATİF VE KANTİTATİF GDO TANISI VE TRANSGEN ANALİZİ

Münevver Merve YILMAZ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof. Dr. Şule ARI

Mayıs, 2012

İSTANBUL

Bu çalışma 19/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Filiz GÜREL
İstanbu Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Tijen TALAS OĞRAŞ
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi
Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 10728 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca, beni çalışmaya teşvik eden, yardımlarını esirgemeyen, engin bilgilerinden yararlandığım ve bana yol gösteren değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Şule ARI**'ya şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan değerli Bölüm Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Avni KURU** başta olmak üzere Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında tezim için önerilerde bulunan, bana olan inançlarını ve güvenlerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım **Dr. Neslihan TURGUT KARA** ve **Dr. Özgür ÇAKIR**'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma, özellikle bu süreçte manevi desteğini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşım **Bilgin CANDAR**'a,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili **AİLEM**'e, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim **Mümin MANDACI**'ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Mayıs, 2012 **Münevver Merve YILMAZ**

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ

TABLO LİSTESİ

SEMBOL LİSTESİ

µl	: Mikrolitre
Bç	: Baz çifti
Bt	: *Bacillus thuringiensis*
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus (Karnabahar Mozaik Virüsü)
Ct	: Cycle threshold (Eşik değer döngüsü)
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür
dH_2O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincir DNA
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
dR	: Delta reaksiyon (ışıma miktarı)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim bağlı immün assay)
EPSPS	: 5-enolpurivilşikimat-3-fosfat sentaz
EURL	: European Union Reference Laboratory (Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı)
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GDB	: Genetiği Değiştirilmiş Bitki
GS	: Glutamin sentetaz
HCl	: Hidroklorik asit
IRMM	: Institute for Reference Materials and Measurements (Referans Materyaller ve Ölçüm Enstitüsü)
ISAAA	: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi)
$MgCl_2$	: Magnezyum klorür
NaCl	: Sodyum klorür
Na_2EDTA	: Disodyum etilendiamin tetra asetik asit
nm	: Nanometre
Nos	: Nopalin sentaz
O.D.	: Optik yoğunluk
PAT	: Fosfinotrisin asetiltransferaz
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PG	: Poligalakturonaz
rDNA	: Rekombinant DNA
RNA	: Ribonükleik asit
RR	: RoundUp Ready
SRM	: Sertifikalı Referans Materyal
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
T-DNA	: Transfer DNA

ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ İŞLENMİŞ SOYA ÜRÜNLERİNDE KALİTATİF VE KANTİTATİF GDO TANISI VE TRANSGEN ANALİZİ

Tarımsal biyoteknolojide yaşanan gelişmeler sayesinde genetik manipulasyonlar kullanılarak herbisit dayanıklılığı ve böceklere direnç gibi bitkiye yarar sağlayan genlerin geleneksel ürünlere aktarımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Başta soya, mısır, pamuk ve kanola olmak üzere birçok genetiği değiştirilmiş bitki çeşidi dünya çapında ekilmekte veya ithal edilmektedir. 2011 yılında dünyadaki toplam GD ekim alanlarının % 47'sini kaplayan soya (*Glycine max* L.) birinci sırada yer almaktadır. Transgenik soya çeşitlerinden olan "RoundUp Ready" (RR), 1996 yılında Kanada'da besin üretimi için kullanımı onaylanan ilk bitki olmuştur ve günümüzde ekimi yapılan transgenik çeşitler arasında en yaygın olandır.

Önemli bir protein ve bitkisel yağ kaynağı olmasından dolayı soya içerikli besin üretiminde GD soya tohumlarının kullanımı giderek artmaktadır. Ülkemizde tüketilen soyanın büyük bir kısmı GD soyaların yetiştirildiği diğer ülkelerden ithal edilmektedir. Bu nedenle, işlenmiş ürünlerde GD soyaların belirlenmesi ve kantitasyonu besin güvenliği ve kalitesi açısından tüketici endişelerinin başında gelmektedir.

Bu tez projesi kapsamında işlenmiş soya ürünlerinde (soya unu, soya kıyması, soya eti, soya kreması, soya sütü, soya kahvesi, soya filizi, tofu) iki farklı DNA izolasyon yönteminin etkinlikleri incelendi. RR soya çeşidi de dahil olmak üzere Avrupa Birliğince onaylanmış pek çok transgenik üründe düzenleyici diziler olarak kullanılan 35S promotorunun ve NOS terminatörünün belirlenmesine dayalı PCR analizi ile çeşitli örnek grupları kalitatif olarak tarandı. Kalitatif analizler sonucunda her iki düzenleyici diziyi de içeren örneklerin (soya eti, soya unu, soya sütü, soya kreması), RR soya kasete özgü 'real time' PCR analizi ile yabancı gen miktarı belirlendi. Sonuç olarak incelenmiş soya kökenli gıda ürünlerinin beşinde (soya eti, soya unu, soya sütü, soya kreması) RR soya çeşidinin varolduğu ve bütün bu örneklerin % 0.9'un altında yabancı gen içerdiği belirlendi.

SUMMARY

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE GMO DETECTION OF PROCESSED SOY PRODUCTS AND ANALYSIS OF TRANSGENE IN TURKEY

Due to the great advances in agricultural biotechology, scientists are able to use artificial genetic manipulations to successfully transfer genes for herbicide tolorance and insect resistance into traditional crops. Many genetically modified plant cultivars especially soybean, corn, cotton and canola have been registered world-wide. The major GM crop species is soybean (*Glycine max* L.), accounting for almost 47% of the total world's GM planted area in 2011. The "RoundUp Ready" (RR) soybean was the first plant approved for food production in 1996 in Canada and is the most common transgenic line planted.

As an important source of protein and vegetable oil, presently the use of soybean GM seeds for soybean-derived food production has been continuously increasing. Most of the soybeans consumed in Turkey are imported from other countries where GM soybeans are grown. Thus, detection and/or quantification of GM soybeans in processed foods is one of the most important consumer concerns regarding food safety and quality.

Within the context of this thesis project, two DNA isolation methods' efficiencies are examined for all processed soy products (soy flour, soy meat, soy crema, soy milk, soy coffee, soy sprout, bean curd). Various sample groups were screened qualitatively by PCR analysis based on determination of 35S promotor and NOS terminator which used as regulatory sequences in RR soybean event and also in many transgenic approved by the European Union. The GM positive samples (soy meat, soy flour, soy milk, soy crema) which contain two sequences were subjected to construct specific detection of RR soy with quantitative real-time PCR. According to the results five of the examined samples (soy meat, soy flour, soy milk, soy crema) indicated presence of RR soy in soy-containing foods and all of these samples contained RR soy below the 0.9%.

GİRİŞ

Dünya nüfusunun 2025 yılı itibarıyla 8 milyarı geçmesi ve bu artışın % 97'sinin gelişmekte olan ülkelerde oluşması beklenmektedir (United Nations, 2007). Hızla artan nüfusun beslenmesi çözülmesi gereken önemli bir sorundur. Kentselleşmenin yaygınlaşması ve tarımsal üretimde kullanılabilecek su kaynaklarının azalması, artan nüfusu besleyecek miktarda üretimi sağlayabilmek için gerekli olan ekilebilir alanların genişletilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerle birim alandan alınan ürün miktarının arttırılması gerekmektedir. Klasik ıslah yöntemleriyle elde edilebilecek biyolojik verim artışının sınırlarına gelinmiş olması yeni teknolojilerin kullanılmasını kaçınılmaz hale getirmiştir. Rekombinant DNA teknolojisinin türler arası gen aktarımını mümkün hale getirmesiyle Genetiği Değiştirilmiş Organizma (GDO)'lar bu amaç doğrultusunda kullanılmaya başlanmıştır. Kullanımı giderek yaygınlaşan genetiği değiştirilmiş bitkilerin (GDB) ekim alanı 1996 yılından 2011 yılı sonuna kadar 94 kat artmış ve 160 milyon hektar alana ulaşmıştır (James, 2011). Küresel GD ekim alanlarının büyük bir çoğunluğunu soya, mısır, pamuk ve kanola oluşturmaktadır. Bu tarım ürünlerinden soya, 75.4 milyon hektar alanla lider durumdadır (James, 2011). Transgenik soya ekim alanının % 90'ında, kimyasal bir herbisit olan glifosata karşı direnç özelliği kazandırılmış "RoundUp Ready" (RR) çeşidi yetiştirilmektedir.

Tarımda büyük ekonomik kayıplara yol açan zararlı organizmalara ve hastalıklara dirençli, herbisitlere toleranslı, ürün kalitesi ve özellikleri arttırılmış genetiği değiştirilmiş tarım bitkileri günümüzde üreticilere büyük avantajlar sağlamaktadır. Kazandırılan özellikler sayesinde ekim alanlarından elde edilen ürün verimi artmaktadır. Ayrıca, biyoteknolojik tarım ürünleri daha az çiftçilik ve pestisit ihtiyacı gerektirdiği için azalan üretim maliyetlerine bağlı olarak gıdaların market fiyatlarının düşmesinde etkin bir role sahiptir (Brookes ve Barfoot, 2009).

Genetik mühendisliği yöntemleriyle elde edilen yeni çeşitlerin sağladığı faydaların yanı sıra insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkileri konusundaki endişeler gün geçtikçe artmaktadır. Tarımsal ürünlerin insanların temel gıdalarını oluşturması nedeniyle allerji, antibiyotiğe direnç, toksin birikimi gibi insan sağlığını tehdit edici rahatsızlıkların ortaya çıkması ve GD çeşitlerden yabani ırklara gen akışının gerçekleşmesinin sonucunda biyoçeşitliliğin yok olması ihtimali bu ürünlerin sıkı bir şekilde incelenip risk değerlendirmelerinin yapılmasını zorunlu kılmıştır. Belirli koşullar altında üretilmesi gereken bu ürünlerin etiketlenmeleriyle de ilgili birçok düzenleme yapılmıştır. Bu düzenlemeler her ülkede farklı yönetmelikler ve kanunlar ile korunmaktadır. Ülkemizde GDO'lu ürünlerin ithalatı, ihracatı, kullanımı, izlenmesi ve etiketlenmesi "Biyogüvenlik Kanunu" ile düzenlenmiştir. Kanuna göre gıda ve yem ürünlerinin GDO'lu olarak değerlendirilmesi ve etiketlendirilmesi için GDO oranının % 0.9 eşik değerinden fazla olması gerekmektedir. Tanımlanmamış ve risk değerlendirmeleri yetkili kurullar tarafından yapılmamış yabancı genleri içeren ürünler için bu eşik değer % 0 olarak belirlenmiştir (27533 sayılı Resmi Gazete, 2010).

Bu tez projesinin amacı, Türkiye'de yetiştirilmiş veya yurt dışından ithal edilerek ülkemizde pazara sunulmuş çeşitli soya ürünlerinde, Avrupa Birliği tarafından onaylanmış "RoundUp Ready" çeşidini içeren örneklerin yabancı gen içeriklerinin DNA temelli metodlar kullanılarak belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda GDO analizinin ilk basamağı olan DNA izolasyonu için kullanılan CTAB yönteminde çeşitli modifikasyonlar yapılarak ürüne özgü en uygun prosedür geliştirildi. Kalitatif PCR analizleri "RoundUp Ready" gen kasetinde bulunan karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotoru ve *Agrobacterium tumefaciens*'e ait nopalin sentaz (NOS) terminatör dizileri hedef alınarak gerçekleştirildi. Yabancı gen oranını belirlemeye yönelik yapılan kantitatif 'real time' PCR analizlerinde ise "RoundUp Ready" gen kasetine özgü CTP4-CP4 EPSPS bölgesine uygun dizilere sahip primerler ve TaqMan probu kullanıldı.

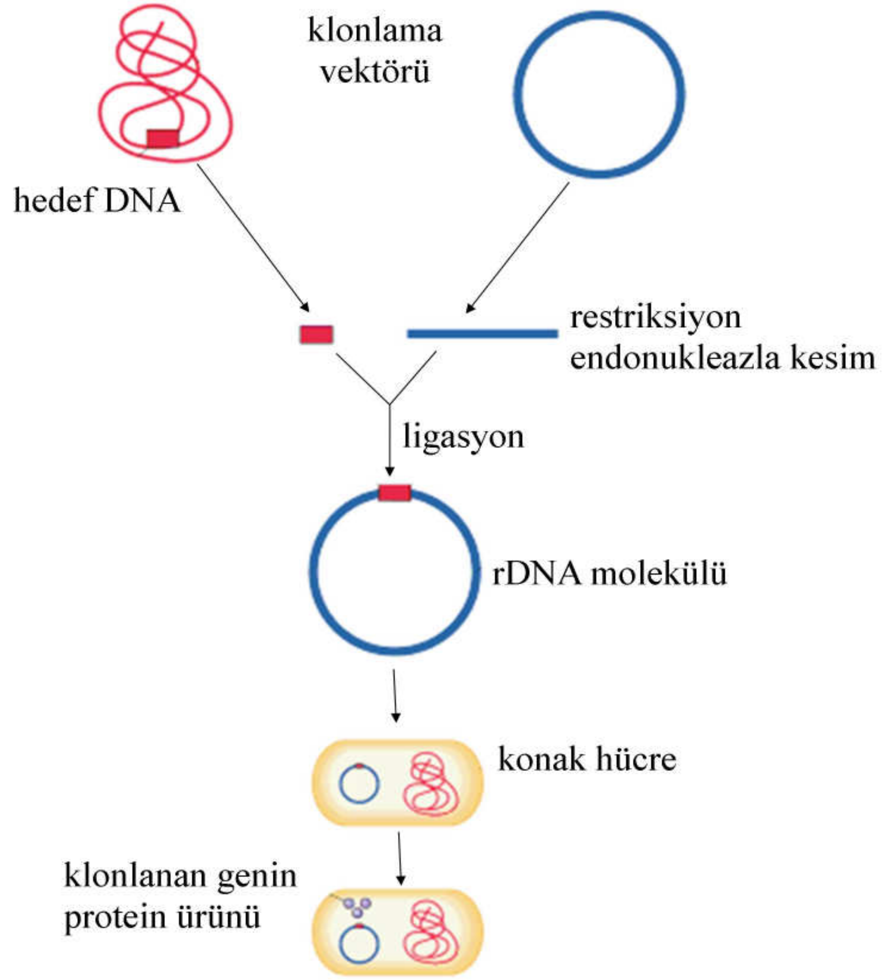
GDO ile ilgili ülkemizde oluşan yasal düzenlemelerin ardından gelişen bu proje süresince elde edilen veriler, marketlerde bulunan ürünlerin yabancı gen içerikleri ile ilgili etiketleme ve izleme denetimleri hakkında fikir verebilecek niteliktedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOTEKNOLOJİ

Biyoteknoloji, biyolojik sistemlerin kullanılmasıyla üretim ve hizmet endüstrilerinde yarar sağlanmasını hedefleyen multidisipliner bir bilim dalıdır. Basit ve pratik biyoteknolojik uygulamalar çok eski yıllara dayanmaktadır. Biyoteknoloji terimi ilk defa 1919 yılında, Karl Ereky tarafından 'Biyolojik sistemler yardımıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürüldüğü işlemler' şeklinde tanımlanmıştır (Budd, 1991). Mikroorganizmaların kimyasal değişikliklere katalizörlük etme özelliklerinden faydalanılarak peynir, yoğurt, sirke, şarap, ekmek üretiminin sağlandığı birçok tarih öncesi teknoloji, biyoteknoloji olarak kabul edilmektedir. Genellikle maya, bakteri ve küf mantarı gibi organizmaların modifikasyona uğratılmaksızın ekonomik değere sahip ürünlerin eldesinde kullanıldığı bu dönem, geleneksel biyoteknoloji olarak nitelendirilmiştir (Parekh ve Gregg, 2004).

1970'li yıllarda genetik mühendisliğinin (rekombinant DNA teknolojisi) yeni bir bilim dalı olarak ortaya çıkması ve gelişen modern tekniklerin bu alana uygulanması, modern biyoteknoloji olarak adlandırılan değişikliğe yol açmıştır. Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisindeki büyük adım; DNA'da kesme, birleşme, modifikasyon yaratan bakteriyal virüs (bakteriyofaj) ve plazmidlerin moleküler genetiğindeki ve nükleik asit enzimolojisindeki gelişmeler sayesinde, restriksiyon endonükleazların (RE) bulunuşu ile atılmıştır (Parekh ve Gregg, 2004). Rekombinant DNA teknolojisinin esası, bir organizmadan izole edilen DNA'nın ilgili parçasının, restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra taşıyıcı bir DNA (vektör) içine ligaz enzimi aracılığıyla yerleşmesine dayanır. Vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülüne rDNA adı verilmektedir. Daha sonra bu molekül bakteri hücrelerine aktarılarak fazla miktarda ilgili gen ürünün üretimi sağlanır (Glick ve diğ., 2010).



Şekil 2.1: Rekombinant DNA üretiminin temel aşamaları (Glick ve diğ., 2010)

1972'de Herbert Boyer ve Stanley Cohen'ın, bakteriden izole edilmiş özgün bir genin diğer konak bakteri hücresine aktarıp ilgilenilen DNA'nın özdeş kopyalarını (klonları) elde etmesiyle ilk başarılı klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. 1974'den itibaren farklı organizmalardan elde edilen genlerin, bakteriye aktarılarak anlatımlarının yapılması sağlanmıştır ve böylece türler arası genetik rekombinasyon gerçekleştirilmiştir (Alisson, 2007). Rekombinant DNA teknolojisinin, türler arası gen aktarımını mümkün hale getirmesiyle tıp, ilaç, çevre, gıda sektörlerinin yanı sıra ziraat uygulamalarında da büyük adımlar atılmıştır.

2.2. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR

Genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak, doğal süreçlerle edinilmesi mümkün olmayan yeni özellikler kazandırılmış organizmalara 'Genetiği Değiştirilmiş veya Transgenik Organizma' adı verilmektedir. GDO'lar mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir.

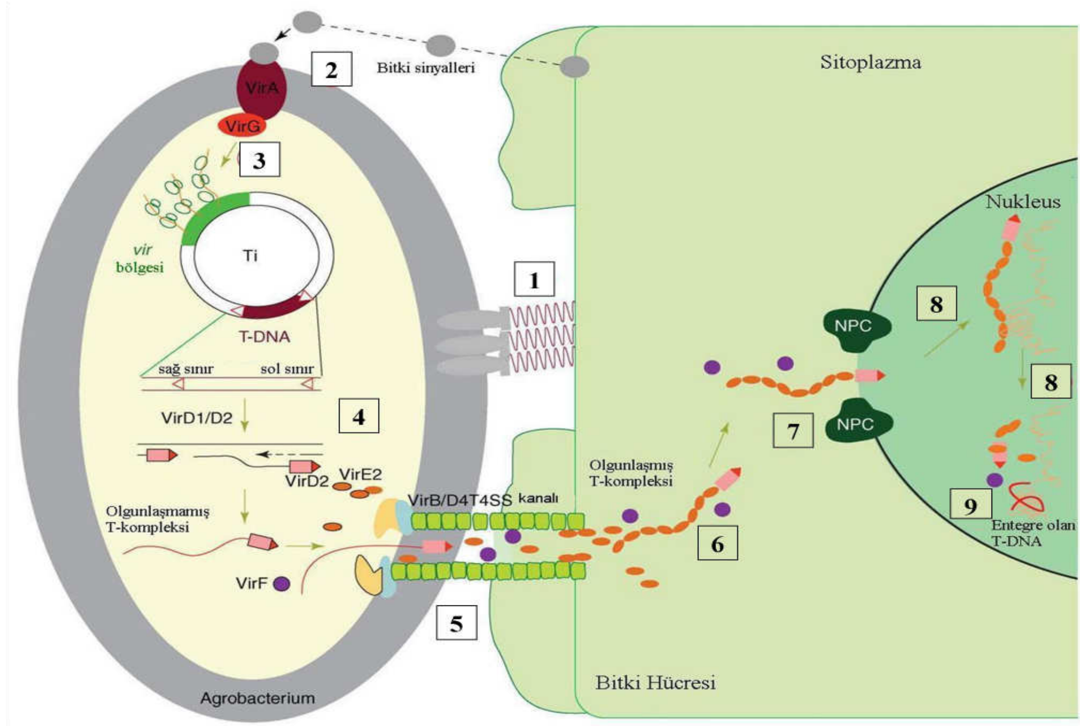
Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar, mikroorganizma kökenli olmayan proteinleri üretmek için rutin olarak kullanılmaktadır. 1978'de insan insülini şifreleyen geni içeren DNA parçasının *Escherichia coli*'ye aktarılması sonucu insülin üreten transgenik bakteri üretilmiştir. Diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan bu ürün, ilk rekombinant biyofarmasötik olarak piyasaya sürülmüştür. İlaç sanayinin yanı sıra tekstil, gıda, deterjan ve çevre sektörlerinde de yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar yeni özellikler kazandırılarak veya istenmeyen özellikler elimine edilerek endüstriyel üretime katkı sağlamaktadır (Han, 2004). Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar sayesinde birçok tedavi edici proteinin üretilmesine rağmen, monoklonal antikor veya koagülasyon kan faktörleri gibi kompleks proteinler bu organizmalarda sentezlenemez çünkü bu proteinlerin olgunlaşmaları, *in vivo* ortamda aktif ve kararlı bir şekilde kalabilmeleri için glikolizasyon, karboksilasyon, katlanma ve proteolitik yıkım gibi translasyon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç vardır (Houdebine, 2009). Bu bağlamda, genetiği değiştirilmiş hayvanlar biyomedikal araştırma alanlarında kullanılarak farmakolojik ürün eldesine katkı sağlamaktadır. Transgenik çiftlik hayvanlarının gıda amaçlı kullanımında ise et verimlerinin artırılması, büyüme hormonu üretimini teşvik eden genin aktarılarak ineklerde süt üretiminin artırılması, peynir üretimi için kazein miktarının artırılması veya laktoza duyarlı tüketiciler için laktozun sütten çıkarılması gibi faydaların sağlanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Bitkilerde genetik mühendisliği uygulamaları genellikle ürün kalitesini arttırmak, zararlı organizmalara direnç sağlamak, herbisitlere ve viral bitki hastalıklarına karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla yapılmaktadır. Tarım faaliyetlerinin başladığı tarihten beri çiftçiler, daha verimli ve çevreye uyumlu genotiplerin kademeli olarak seçilip yetiştirilmesiyle klasik ıslah yöntemleri geliştirmiş ve uygulamaya

başlamıştır. Özellikle İkinci Dünya Savaşı sonrasında, tarım geliri ile toprak ve iklim koşullarının kısıtlayıcı olmadığı tüm ülkelerde, tarımsal verimlilikte beklentilerin ötesinde artışlar kaydedilmiştir. 'Yeşil Devrim' olarak adlandırılan söz konusu büyüme döneminde klasik bitki ıslahı, ticari gübreler ve diğer tarımsal tekniklerin gelişimi etkili olmuştur. Ancak yıllar içerisinde yoğun gübreleme ve tarım ilaçları, su kaynaklarının kirlenmesine, erozyona ve toprağın veriminin azalmasına neden olmuştur. Yeşil devrim, gen transferine dayanmayan klasik ıslah çalışmalarıyla yürütülürken bu dönemin engellerini ve beraberinde getirdiği olumsuzlukları, genetik mühendisliği ve doku kültürü uygulamalarının etkili olduğu 'Gen Devrimi' ile aşmak mümkün olmuştur. İlk kez 1983 yılında, tütün bitkisinde gen aktarımının gerçekleştirilmesiyle günümüzde dünya ekonomisinde önemli bir yere sahip genetiği değiştirilmiş bitkilerin (GDB) üretimi için ilk adım atılmıştır (Budd, 1991).

2.3. BİTKİLERDE GENETİK MODİFİKASYON

Bitkilerde gen aktarımı doğal olarak meydana gelebilen bir mekanizmadır. Gram negatif bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens*, bitkilerde yaralanma ya da hasar sonucunda bitki dokularına girerek "taç tümörü" oluşumuna neden olan bir mikroorganizmadır. Bu tümör oluşumunun bakteri hücrelerinde bulunan bir plazmidin (Ti plazmidi) küçük bir bölümü (T-DNA) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Chilton ve diğ., 1977). Bitkinin *Agrobacterium* ile enfeksiyonu sonucunda Ti plazmitinin üzerinde bulunan ve tümör oluşumundan sorumlu genleri taşıyan T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve bitki kromozomu ile bütünleşmektedir (Chilton ve diğ., 1980; Willmitzer ve diğ., 1980). Bu bölgenin transkripsiyonu ile tümör oluşumu gerçekleşmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.2: *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında gerçekleşen temel moleküler olaylar (Tzfira ve Citocsky, 2006)

T-DNA sınırları arasına yerleştirilmiş herhangi bir yabancı DNA'nın bitki hücrelerine transfer edilebilmesi özelliği kullanılarak hastalığa neden olan genleri, aktarımı istenen özel DNA dizisi ile değiştirilmesiyle modifiye *Agrobacterium* suşları geliştirilmiştir. 1980'lerde geliştirilen bu yöntem en eski gen aktarım yöntemidir ve birçok bitkinin genetik manipülasyonunda başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Fakat *Agrobacterium*'un yalnızca dikotiledonları doğal olarak enfekte etmesi nedeniyle uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda monokotilodonlara gen aktarımında kullanılması oldukça sınırlı kalmıştır (Tzfira ve Citovsky, 2006). Bu engelleri aşabilmek için biyolistik, elektroporasyon, protoplast füzyonu ve mikroenjeksiyon gibi alternatif doğrudan gen aktarımı yöntemleri geliştirilmiştir (Arı, 2004). Gen aktarımında kullanılan bu ve bunun gibi başka teknikler tarımda yeni çeşitlerin geliştirilmesinde sınırsız olanaklar sunmaktadır.

Gen aktarılmış bitkide aktarılan genin (transgen) yüksek düzeyde anlatım yapması ve anlatımının kontrol edilmesi son derece önemlidir. Bu nedenle transgenik bitki üretilirken yalnızca yapısal genler aktarılmaz; geni düzenleyici diziler olan promotor

ve terminatör bölgeleri içeren, 'gen kaseti' olarak adlandırılan sentetik yapılar şeklinde aktarılırlar. RNA polimerazın tanıyıp bağlanabileceği, transkripsiyonun başlaması için gerekli olan promotor ve transkripsiyonu sona erdiren terminatör bölgeleri, gen anlatımının lokasyonunu ve seviyesini de kontrol edebilmektedir (Michelini ve diğ., 2008). Günümüzde, yüksek transkripsiyon aktivitesinden dolayı CaMV'a ait konstitütif bir promotor olan 35S ve durdurucu dizi olarak *Agrobacterium tumefaciens*'e ait NOS terminatörü birçok transgenik bitkide kullanılmıştır (Elenis ve diğ., 2008). Ayrıca, gen aktarımı çalışmalarında transformantların yabancı DNA'yı almamış dokulardan/hücrelerden ayırt edilebilmesi için aktarılan DNA kasetlerinde antibiyotiğe direnç geni gibi işaret genler de bulunmalıdır.

2.4. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BİTKİLER

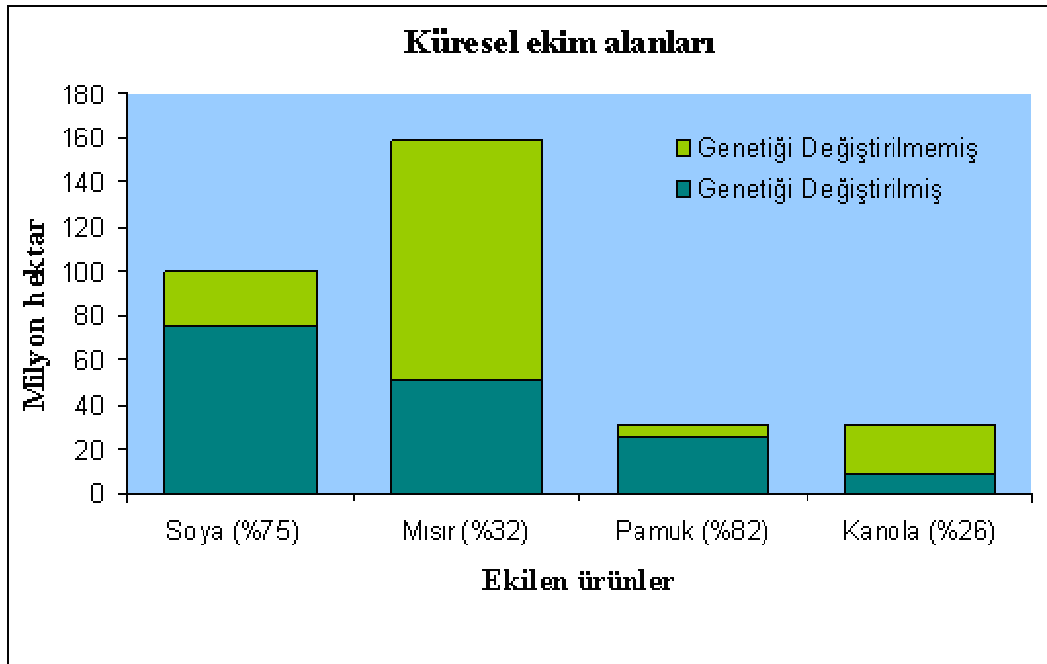
Genetiği değiştirilmiş (GD) bir ürünün geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi birçok basamaktan oluşan, çok uzun yıllar alan bir süreçtir. GD ürünün gelişim sürecinde ürünün kalitesinin ve bütünlüğünün korunması, GD ürünün tanımlanması ve izlenebilirliği için etkili araçların geliştirilmesi yeni bir GD ürününün başarısı için zincirin esas bileşenlerini oluşturmaktadır (Gupta ve Ram, 2004). Bu zorlu süreçlere rağmen ilk kez 18 Mayıs 1994'te genetiği değiştirilmiş bir ürün ticarileştirilmiştir (Kramer ve Redenbaugh, 1994). FLAVR SAVR™ ticari adıyla piyasaya sürülen domateste, poligalakturonaz (PG) enziminin gen anlatımını düzenleyen bir antisens RNA kullanılmıştır (Sheehy ve diğ., 1987). PG enzimi meyvenin olgunlaşması sırasında pektin metabolizmasında rol oynayan en önemli enzimdir. Olgun domateste en bol bulunan proteindir ve meyvenin yumuşamasından sorumludur (Hobson, 1965; Brady ve diğ., 1985). PG geninin anlatımını azaltacak bir antisens RNA yöntemi, olgunlaşan domateste pektin çözünürlüğünün düşmesine neden olduğundan domates uzun süre taze kalabilmektedir.

İlk GD ürünün piyasaya sürülmesinden sonra, dünyada yeni ve hızla büyüyen bir sektör ortaya çıkmış ve GD tohumların ekildiği tarım alanları düzenli olarak artmıştır. 1996-2011 yılları arasında GD ürünlerin üretimi 94 kat artarak toplam üretim alanı 160 milyon hektara ulaşmıştır. Bu nedenle GDO'lar son zamanlarda

tarım alanlarına en hızlı adapte olan teknolojik ürünler olarak görülmektedir. 2011 yılında transgenik ürün ekimi yapan 29 ülkenin 19'unu gelişmekte olan, kalan 10'unu ise gelişmiş ülkeler oluşturmaktadır (James, 2011). 31 ülke ise GD ürünleri ithal etmektedir, diğer bir deyimle toplam 60 ülke yasal düzenlemelere bağlı olarak GD ürünlerin üretimini ve/veya ithalatını kabul etmiştir. 2011 yılı itibariyle Türkiye, transgenik ürün ithalatını kabul etmiştir.

2011 yılında GDO ekim alanı 1 milyon hektarı aşmış ilk 10 ülke şöyledir; ABD (69 milyon hektar), Brezilya (30.3 milyon hektar), Arjantin (23.7 milyon hektar), Hindistan (10.6 milyon hektar), Kanada (10.4 milyon hektar), Çin Halk Cumhuriyeti (3.9 milyon hektar), Paraguay (2.8 milyon hektar), Pakistan (2.6 milyon hektar), Güney Afrika (2.3 milyon hektar), Uruguay (1.3 milyon hektar). Geri kalan 19 ülke ise ekim alanı büyüklüklerine göre şöyle sıralanmaktadır; Bolivya, Avustralya, Filipinler, Myanmar, Burkina Faso, Meksika, İspanya, Kolombiya, Şili, Honduras, Portekiz, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Mısır, Slovakya, Romanya, İsveç, Kosta Rika ve Almanya.

ISAAA (Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarının Kazanımları Servisi) raporuna göre son 10 yıllık süreçte GD bitkilerden en fazla üretilen ve üretimi devamlı artış gösteren ürün soya olmuştur. Soya, 75.4 milyon hektarla küresel transgenik ürün ekim alanının % 47'sini oluşturmaktadır. İkinci sırada 51 milyon hektarla mısır (% 32), üçüncü sırada 24.7 milyon hektarla pamuk (% 15), dördüncü sırada ise 8.2 milyon hektarla kanola (% 5) gelmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Ürünlere göre küresel GD bitki ekim oranları (James, 2011)

Herbisite dirençli çeşitler, 93.9 milyon hektarlık ekim alanı ile GD bitkiler arasında % 59'luk bir paya sahip olarak lider durumdadır. 2011 yılında kombine ("stacked") ürünler 42.2 milyon hektarla, 160 milyon hektar olan küresel ekim alanının % 25'ini oluşturmaktadır. İki veya daha fazla özelliği bir arada bulunduran kombine ürünler (genellikle herbisit toleransı+böcek direnci), 23.9 milyon hektarlık ekim alanına sahip böcek dirençli varyetelerden daha geniş alanda ekimi yapılmış ve 2010-2011 arasında en hızlı artış gösteren transgenik ürünler olmuştur.

2.5. BİRİNCİ NESİL GDB'LERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

GD ürünlerin ticarileşmesinin ilk yıllarındaki çalışmalar herbisit toleransı, böcek ve patojen direnci gibi girdiye yönelik yani doğrudan çiftçiyi ilgilendiren, tarım bitkilerinin yetiştirilmesine yardımcı olan özelliklere odaklanmıştır. Birinci nesil GDB'lerin üretim amacı çiftçinin kâr oranını ve ürün verimini arttırmak olmuştur (Korth, 2008). Yaygın olarak kazandırılan herbisit toleransı özelliği, çiftçilerin üretim maliyetlerini önemli ölçüde azaltmaktadır. Ayrıca özellikle mısır ve pamuk yetiştiriciliğinde zararlı tırtıllara karşı etkili olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoksinini şifreleyen genin aktarıldığı bitkilerin üretiminde tarımsal mücadele

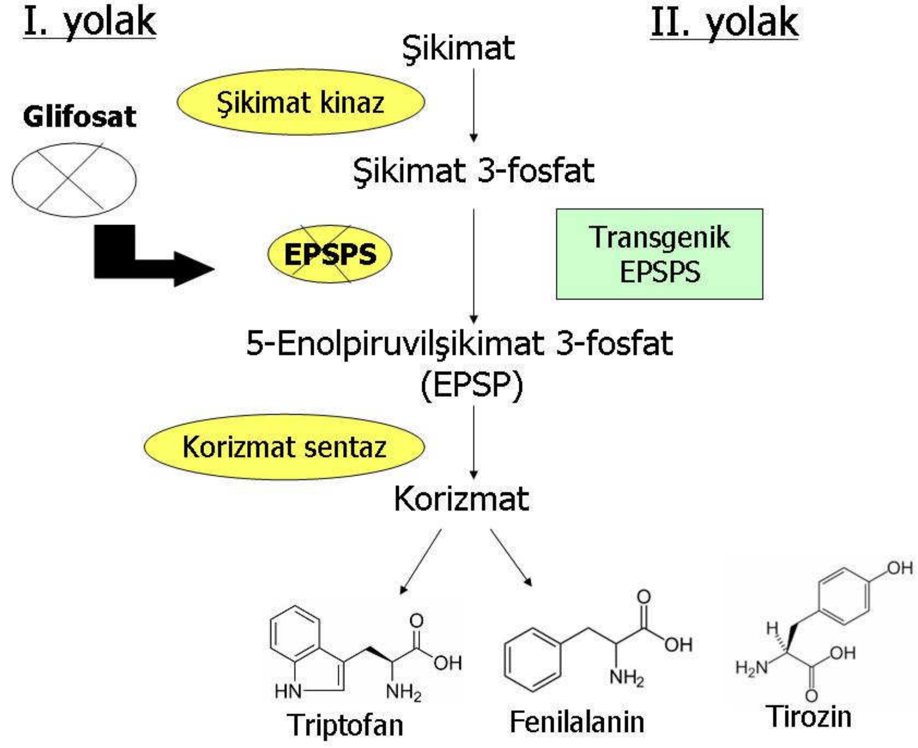
ilaçlarının kullanımı azalmakta, böylece hem üretim maliyeti düşmekte hem de kimyasal ilaçların çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kalkmaktadır.

2.5.1. Herbisit Toleransı

Herbisit, tarım alanlarında bulunan ve yetiştirilen kültür bitkisine zarar veren yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasallara verilen isimdir. Herbisitler genelde, bitkinin hayatta kalması için gerekli olan metabolik yolları hedefleyerek çalışır. Yabancı otlarla kimyasal mücadelede kullanılan herbisitin seçiciliği ve toksisitesi önemli parametrelerdir (Öktem, 2004). Bu bağlamda, en etkili herbisitler arasında yer alan glifosat ve glifosata direnç özelliği kazandırılmış transgenik bitkiler tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glifosat, ticari RoundUp™ herbisitinin etken maddesidir. Bu nedenle, glifosata direnç kazandırılmış transgenik ürünlere "RoundUp Ready" adı verilmiştir. Glifosat, 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimine bağlanarak ve onu inhibe ederek çalışır. Bu enzim tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik amino asitler de dahil olmak üzere, korizmat türevli metabolitlerin sentezini sağlayan şikimat yolunda iş görür (Hermann, 1995). EPSPS inhibitörünün ortamda var olması amino asit üretim aktivitesini inhibe eder ve böylece hücre, ölüme sürüklenir.

Glifosata dirençli transgenik ürün elde etmek için kullanılan üretim stratejilerinde, bitkilerde fonksiyonel olan ama herbisitlerden etkilenmeyen bir EPSPS formu kullanılmıştır. EPSPS bitkilerin yanı sıra bakterilerde de bulunabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda glifosat uygulamasına duyarlı olmayan, bu nedenle herbisit uygulandığında inhibisyona uğramayan EPSPS formu bir toprak bakterisinde (*Agrobacterium tumafaciens* CP4 suşuna ait) tanımlanmıştır. Hedef bitki, EPSPS geninin aktarılmasıyla glifosat esaslı veya ticari adıyla RoundUp™ herbisitine karşı direnç kazanmaktadır (Korth, 2008). Bu sayede tarlaya glifosat uygulaması yapıldığında yetiştirilen ürüne zarar gelmemekte ancak diğer yabancı otlar ölmektedir (Şekil 2.4).

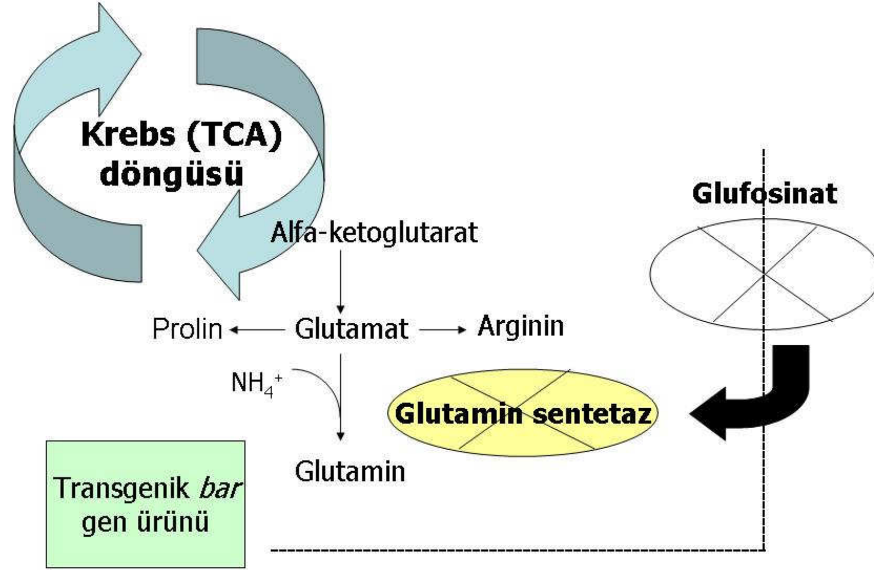


Şekil 2.4: I. yolakta RoundUp™ herbisitinin etki mekanizması, II. yolakta transgenik EPSPS'nin glifosattan etkilenmemesi ve EPSP'nin sentezlenmesi

Glifosat direnci; herbisitten etkilenmeyen, aktif bir hedef enzim olan EPSPS'nin anlatımı aracılığıyla mümkün olur. Herbisit direnci kazandırılması için başka bir yol ise, bitkilere spreylendiğinde herbisitin etkisinin ortadan kalkmasını sağlayan bir proteinin bitkide anlatımını sağlamaktır. Bu yaklaşım glufosinat herbisitine direnç sağlamak için kullanılır. Glufosinat, Liberty™ herbisitinin etken maddesidir ve bu nedenle glufosinat direnci kazandırılmış transgenik ürünlere "Liberty Link" adı verilmiştir. Glufosinat, glutamin amino asitinin sentezinden sorumlu enzim olan glutamin sentetaz (GS) enzimini inhibe ederek bitkinin ölümüne sebep olur. GS, bitkideki azot fazlasını amonyum formunda kullanarak amino asit yapısında yer alacak bitkisel azota dönüştürür (Tan ve diğ., 2006). Glufosinat uygulanmış bitkilerde GS'nin inhibe olmasıyla bitkideki amonyum konsantrasyonu toksik düzeye ulaşır.

Glufosinat, doğada bazı *Streptomyces* bakterilerinde doğal olarak üretilir. Bu bileşiğin fitotoksik aktivitesine ek olarak, diğer bakterilere karşı toksik etki göstermesi antibiyotik olarak da iş görmesine neden olmaktadır. Glufosinat dirençli

bakteri suşları *bar* geni tarafından şifrelenen, fosfinotrisin asetiltransferaz (PAT) adlı bir enzimi üretir (Korth, 2008). Glufosinatı parçalayan *bar* geni, gram pozitif toprak bakterisi olan *Streptomyces hygroscopius* suşundan izole edilmiş ve birçok tarım bitkisine aktarılmıştır (Şekil 2.5).

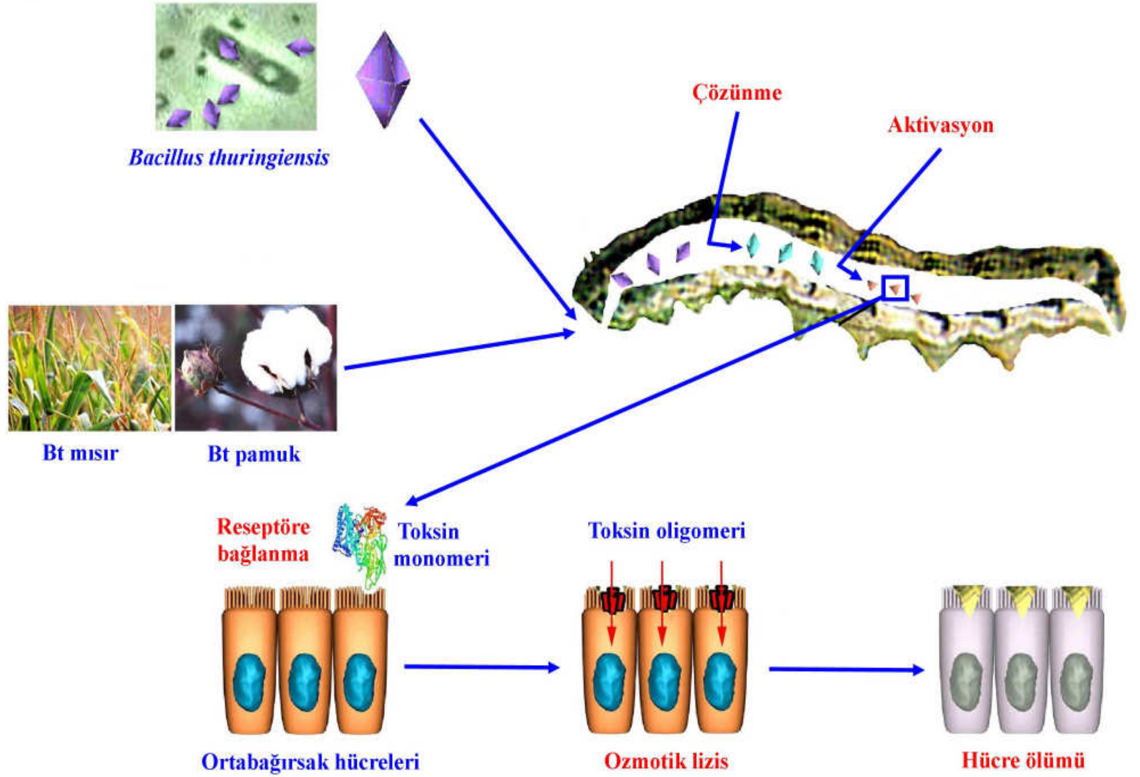


Şekil 2.5: “Liberty Link” bitkilerinde glufosinat direnci kazandırılması, herbisiti doğrudan hedefleyen ve etkisizleştiren bir enzimi şifreleyen genin anlatımıyla yapılması

2.5.2. Böcek Direnci

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal yöntemler (insektisit kullanımı) için uygulanan girişimlerde harcanan büyük miktarlarda para ve emeğe karşın, oluşan kayıpların önlenememesi nedeniyle, gen teknolojisi yöntemleri kullanılarak farklı mücadele yolları tercih edilmektedir. Bu mücadele yöntemleri, böcekler üzerinde toksik etki yapan proteinlerin (insektisidal proteinler) sentezinden sorumlu genlerin bitkilere aktarılarak transgenik bitkilerin geliştirilmesi esasına dayanmaktadır (Öktem, 2004). Günümüzde en yaygın olarak kullanılan genler, gram pozitif bir toprak bakterisi olan *Bacillus thuringiensis*’in δ-endotoksin proteinlerinin (Bt) sentezinden sorumlu olan *cry* genleridir. Bt endotoksin proteinlerinin doğal böcek öldürücü etkinliği, çoğu zaman yararlı böcekler, kuşlar, balıklar ve memeliler üzerinde seçici olmayan toksik etkileri olan sentetik kimyasal böcek öldürücülere karşı cazip bir alternatif oluşturmaktadır.

Bt gibi toksik proteinleri şifreleyen *cry* genleri adını, spor oluşturma evresine girdiğinde bakterinin içerisinde oluşan kristal inkluzyonlarından alır. Bu kristaller çoğunlukla birden fazla sayıda özgün *cry* gen ürünü içerir. Toksik hale gelmeden önce, *cry* geni tarafından şifrelenen Bt proteinleri protoksinler olarak bulunur ve böceğin sindirim sisteminde aktifleşmeleri gerekir. Toksine duyarlı bir böceğin sindirim sistemine girdikleri zaman, kristaller orta bağırsağın genellikle pH'sının 8'den büyük olduğu alkali ortamında eriyerek parçalanır. Bu aşamada Bt protoksin proteinlerinin uçları, bağırsaktaki özel proteaz enzimleri tarafından kesilir ve toksik protein ortaya çıkar. Daha sonra aktif protein, böceğin orta bağırsağındaki mikrovilluslu membranda özel protein reseptörlerine bağlanır. Reseptöre bağlanan aktif Bt toksini böcek hücre zarından içeri girerken çok sayıda proteinin oligomerize olmasıyla por oluşur (Korth, 2008). Porların oluşumu, zardan iyon sızıntısına neden olduğundan zar ozmotik lizise uğrar ve parçalanır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: *Bacillus thuringiensis*'e ait *cry* geni aktarılmış transgenik bitkilerin böcek üzerindeki etki mekanizması

2.6. İKİNCİ NESİL GDB'LERE KAZANDIRILAN ÖZELLİKLER

Tüketicilerin kullanımına yönelik geliştirilmiş bitkisel ürünler olan ikinci nesil GDB'ler piyasada henüz çok yaygın değildir. Biyoteknoloji yöntemleri aracılığıyla bitkilerin besin değerlerini değiştirmek veya geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalar devam etmektedir. "Altın pirinç" olarak adlandırılan beta karoten/A vitamini içeriği yükseltilmiş çeltik, ikinci nesil GDB'lere verilebilecek en güncel örnektir ancak henüz ticarileşmemiştir. İlaç hammaddesi ve monoklonal antikor üretimi de ikinci nesil transgenik bitkilerin potansiyel kullanım alanına girmektedir. Bu amaç doğrultusunda Hepatit B yüzey antijeni aktarılmış patates ve muz bitkilerinin sera ve tarla denemeleri halen devam etmektedir. Yine bugün itibarıyla kullanımda olmasa da, soya ve kanola gibi yağlı tohum bitkilerinden biyodizel üretimini geliştirmek için transgenik uygulamalardan yararlanılabilir (Korth, 2008).

Avrupa Birliği tarafından onaylanmış herhangi bir ikinci nesil soya çeşidi yoktur ancak diğer bazı ülkeler tarafından onaylanmış üç soya çeşidinde de yağ asidi içeriği değiştirilmiştir.

2.6.1. Yağ Asidi İçeriğinin Değiştirilmesi

Bitkilerin ürettiği yağ asitleri, gıdalarda kullanılan yağların kaynağı olmakla birlikte kozmetik, deterjan ve plastik endüstrilerinde de uygulama alanı bulur. Kanola ve soya uzun yıllardır bitkisel yağ kaynağı olarak kullanılmaktadır. Genetik mühendisliği uygulamaları kullanılarak yapılan modifikasyonlar sonucu yetiştirilen transgenik kanola ve soyalardan elde edilen yağ asitleri sayesinde daha sağlıklı gıda ürünleri elde edilmektedir.

Transgenik soyada Δ_{12} –desatüraz adı verilen enzimin düzeyi düşürülerek, oleik asit düzeyi artırılabilir. Enzim anlatım düzeyini azaltmak için normal soya *fad2* geninin şifrelediği Δ_{12} –desatüraz enzimi gen susturma tekniğiyle baskılanır; genin ikinci bir kopyası bitkiye sokulur. Hedef genin ikinci kopyasının aşırı miktarda anlatımının yapılması, bitkide hem endojen genin hem de transgenin anlatımının durdurulması cevabını tetikler. Bu durumda, *fad2* geninin susturulması yüksek düzeyde oleik asit oluşumuna neden olur ve buna karşılık diğer 18-karbonlu yağ asidi, linoleik ve

linolenik asitlerin oluşum düzeyi düşer (Korth, 2008). Bu üç yağ asidinin yapıları arasındaki tek fark zincirdeki çift bağların sayısıdır. Sonuç olarak, yüksek miktarda oleik asit içeren soyalar, düşük miktarda doymuş yağ ve transyağ içerir. Bu da, margarin benzeri gıdaların yapımı için soya yağını uygun hale getirmek amacıyla sıklıkla kullanılan hidrorejenerasyon sürecine ihtiyacı azaltmakta ve daha sağlıklı ürünler ortaya çıkmaktadır.

2.7. SOYA

Latince adı *Glycine max* (L.) Merr. olan soya, Fabaceae (Leguminoseae) ailesinin üyesidir ve 2n=40 kromozoma sahip diploidize olmuş bir tetraploiddir (Schmutz ve diğ., 2010). Soyanın taksonomisi Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1: Soyanın taksonomisi (Anonim, 2012a)

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Alt aile	Faboideae
Cins	*Glycine*
Alt cins	*Soja*
Tür	*Glycine max*

Tohumlarında % 18-24 yağ, % 35-45 protein, % 30 karbonhidrat, % 5 oranında da mineral ve çok sayıda vitamin içeren soyanın dünyadaki üretimi, kullanım alanlarının genişlemesine bağlı olarak giderek artmaktadır. 100 g soyanın besin değeri Tablo 2.2'de kısaca özetlenmiştir.

Son yıllarda insan sağlığı dikkate alınarak, daha çok bitkisel beslenmenin ön planda tutulduğu yeni beslenme alışkanlıkları içerisinde, ana vatanı Uzak Doğu olan pek çok ürüne yer verilmeye başlanmıştır. Kolestrol içermeyen yapısı, yüksek kaliteli protein içeriği ve baklagiller içinde en kolay sindirilen ürün olma özelliği ile çeşitli kullanım alanları bulunan bitkisel bir gıda maddesidir (Friedman ve Brandon, 2001). Soya taneleri çimlendirilip filizleri sebze olarak yenebileceği gibi, işlenerek soya

yağı, soya unu, soya eti, soya sütü, soya sosu, tofu, soya kahvesi ve soya kreması elde edilebilir. Ekmek, kurabiye, bisküvi, kek, makarna gibi hamur ürünleri, bebek mamaları, şekerleme ürünleri ve kuru/soğuk hazır yemek karışımları ise genellikle emülgatör olarak soya kıyması, soya unu veya soya lesitini içermektedir.

Tablo 2.2: 100 g soyanın besin değeri (USDA, Nutrient Database for Standart Reference)

İçeriği	Miktarı
Su	8.54 g
Enerji	446 kcal
Protein	36.49 g
Doymuş yağ asitleri	2.884 g
Doymamış yağ asitleri	15.659 g
Karbonhidrat	30.16 g
Şeker	7.33 g
Kalsiyum	277 mg
Demir	15.70 mg
Magnezyum	280 mg
Fosfor	704 mg
Potasyum	1797 mg
Sodyum	2 mg
Çinko	4.89 mg
Askorbik asit	6 mg
Thiamin	0.874 mg
Riboflavin	0.870 mg
Niacin	1.623 mg
B-6 vitamini	0.377 mg
Folat	375 µg
A vitamini	1 µg
E vitamini	0.85 mg
K vitamini	47 µg

Türkiye'de gıda sektöründe yeni yeni yaygınlaşmaya başlayan tüketiminin dışında soya, ağırlıklı olarak yem sektöründe kullanılmaktadır. Soyanın dünyadaki tüketiminin hızlı artışının nedeni, sadece insan sağlığına faydalı bir besin olması ve yem olarak kullanılmasından kaynaklanmamaktadır. Soya; tutkal, sabun, biyoyakıt, mürekkep, insektisit, alkol, plastik ve lastik gibi birçok endüstriyel üretimde de kullanılan ender tarla bitkilerinden biridir.

Soya Uzak Doğu kökenli olmasına rağmen, günümüzde en büyük üreticisi ABD'dir. Kullanım alanlarının yaygınlaşmasına paralel olarak dünya tüketiminde önemli bir yere sahip olan soyanın üreticisi olan diğer ülkelerin başında Brezilya, Arjantin, Çin Halk Cumhuriyeti ve Hindistan gelmektedir. Türkiye'de ise 1930'lu yıllarda Karadeniz Bölgesi'nde ekimine başlanmış ve son 20 yıldan itibaren de Akdeniz Bölgesi'nin sulanabilen alanlarında yetiştirilmektedir (Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Soya Raporu, 2010).

2.8. TRANSGENİK SOYALAR

Her bir genetik modifikasyon işlemi özgündür. Hedef bitki ve transgen aynı olsa bile, söz konusu transgenin genom ile entegrasyonu modifiye edilen her hücrede diğerinden bağımsız bir şekilde olmaktadır. Bu nedenle genetik modifikasyon sonucunda oluşan her bir ürüne ayrı bir çeşit ("event") veya transgenik ırk denilmektedir (Çetiner ve Budak, 2007).

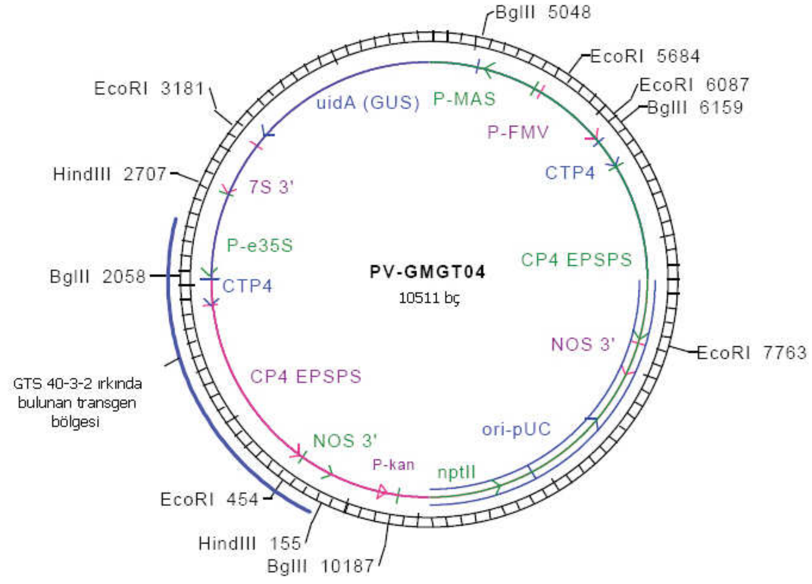
Günümüzde toplam 25 bitki türünde 65 mısır, 39 pamuk, 15 kanola ve 14 soya olmak üzere toplam 196 GD çeşit birçok ülkede ekilmekte veya ithal edilmektedir (James, 2011). Şu anda piyasada sadece 14 çeşit GD soya bulunmasına rağmen, soya 75.4 milyon hektarlık ekim alanıyla GD bitkiler arasında ilk sıradadır. Transgenik soya içeren gıdalar dünya pazarında yaygın olarak yer almaktadır. GD soyalardan glifosat herbisitine dayanıklılık kazandırılmış "RoundUp Ready" 1996'da, besin üretiminde kullanılması onaylanan ilk transgenik bitki çeşidi olmakla birlikte günümüzde tüm GD çeşitler içerisinde en çok satılan ve ekilen tohum olma özelliğini de korumaktadır (James, 2011). Diğer transgenik soya çeşitleri, kazandırılan özellikler ve üretici firmaları Tablo 2.3'de özetlenmiştir. Avrupa Birliği tarafından onaylanmış GTS 40-3-2, A2704-12, MON 89788 transgenik soya ırklarının hepsinde de herbisite tolerans özelliği kazandırmak için biyoteknolojik yöntemler uygulanmıştır.

Tablo 2.3: Piyasadaki GD soya çeşitleri (ISAAA, GM Approval Database)

Transgenik çeşit	**Üretici firma**	**Kazandırılan özellik**
A2704-12/ A2704-21/ A5547-35	Aventis	Glufosinat herbisitine tolerans
W62/ W98	Bayer	Glufosinat herbisitine tolerans
G94-1/G94-19/G168	DuPont/Pioneer	Yüksek oleik asit içeriği
MON 87701	Monsanto	Böcek direnci
MON 87701XMON 89788	Monsanto	Böcek direnci ve glifosat herbisitine tolerans
MON 87705	Monsanto	Yüksek oleik asit içeriği
A5547-127	Bayer	Glufosinat herbisitine tolerans
DP305423	DuPont/Pioneer	Yüksek oleik asit içeriği ve ALS inhibitörüne tolerans
DP305423XGTS 40-3-2	DuPont/Pioneer	Yüksek oleik asit içeriği ve glifosat herbisitine tolerans
DP356043	DuPont/Pioneer	Glifosat herbisitine ve ALS inhibe eden herbisitlere telorans
CV 127	BASF ve EMBRAPA	İmidazolinon herbisitlerine tolerans
GTS 40-3-2	Monsanto	Glifosat herbisitine tolerans
GU262	Bayer	Glufosinat herbisitine tolerans
MON89788	Monsanto	Glifosat herbisitine tolerans

2.8.1. "GTS 40-3-2" Soya Çeşidinin Özellikleri

Ticari adı "RoundUp Ready" soya olarak bilinen GTS 40-3-2 transgenik soya hattı, Monsanto Kanada Şti. tarafından soya üretiminde zararlı bitkilerle mücadelede alternatif bir sistem olarak glifosatın kullanımına olanak sağlamak için geliştirilmiştir. GTS 40-3-2 ırkının geliştirilmesi, *Agrobacterium tumefaciens* suşu CP4'den izole edilen glifosat dirençli EPSPS enzimini şifreleyen genin, ticari soya çeşidi A5403'e partikül bombardımanı yoluyla aktarılmasıyla oluşturulmuştur. Transformasyonda kullanılan plazmid vektörün haritası Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7: GTS 40-3-2 ırkının transformasyonunda kullanılan PV-GMGT04 vektörünün genetik elementlerini içeren plazmid haritası (Monsanto, 2000)

PVGMGT04 plazmidi insersiyon için tasarlanmış üç gen kaseti içermektedir. Bunlardan ikisi CP4 EPSPS kodlayan diziyi, biri uidA kodlayan diziyi içermektedir. Fakat analizler sonucu GTS 40-3-2'de sadece, glifosat tolerans genini içeren tekil bir integrasyon bölgesi bulunmuştur (Padgette ve diğ., 1995). Aktarımı gerçekleşen EPSPS geni, CaMV kaynaklı kuvvetli bir konstitütif promotor olan 35S ve *A. tumefaciens* kaynaklı NOS terminatörü ile kontrol edilmektedir (Şekil 2.8). Bitki kökenli, kloroplast transit peptidi (*Petunia hybrida*'dan CTP4) kodlayan DNA dizisi glifosat tolerans geninin 5′ ucuna klonlanmıştır.



Şekil 2.8: "RoundUp Ready" soya gen kasetinin şematik gösterimi. P-E35S: Karnabahar mozaik virüsünün 35S promotoru, CTP4: *Petunia hybrida* kaynaklı kloroplast transit peptidi, CP4 EPSPS: *Agrobacterium tumefaciens* CP4 suşundan 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentaz geni, T-nos: *Agrobacterium tumefaciens* kaynaklı NOS terminatörü (Querci, 2006)

EPSPS genine birleştirilen sinyal peptidi yeni sentezlenen enzimin şikimat yolunun bulunduğu ve glifosatın etkisini gösterdiği kloroplastlara geçişini sağlar. Geçiş

gerçekleştikten sonra, transit peptidi özel bir proteaz ile enzimden ayrılır ve hızlı bir şekilde parçalanır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda, işlevsel olan birincil gen entegrasyon bölgesinin 3′ proksimal ucunda, NOS terminatörüne bitişik 250 bç ve 72 bç'lik iki küçük, işlevsel olmayan DNA dizisinin bulunduğu da belirtilmiştir (Windels ve diğ., 2001).

2.9. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALAR VE BİYOGÜVENLİK

GD gıdalar dünya marketlerine girdiğinden bu yana çevre ve insan sağlığı üzerine olası olumsuz etkileri tartışma konusu olmuştur. GDO karşıtı bir topluluğun oluşmasına neden olan endişelerin başında; transgenik ürünlerden yabani tip akrabalarına olası gen akışının gerçekleşmesi, alerjik reaksiyon riskinin artması, antibiyotik direncinin gelişmesi ve biyoçeşitliliğin yok olması gelmektedir (Michelini ve diğ, 2008).

Monsanto, Syngenta, Pioneer gibi Amerikan şirketleri GD ürünlerin esas geliştiricisidir. Geliştirilen transgenik ürünler başlıca Amerika, Kanada, Arjantin ve Brezilya'da ekilip diğer ülkelere gıda ve yem olarak ihraç edilmektedir. Avrupa Birliği ise GDO güvenilirliği, GDO eşik değeri, GDO etiketleme, GDO tanısı ve GDO'lu ürünlerin GDO'suz ürünlerle bir arada bulunmasındaki sınırlara dair düzenlemeleriyle sert bir bakış açısı sergilemektedir (Davison, 2010). Avrupa Birliği'ne üye ve aday devletler, *"Cartagena Protokolü"* olarak bilinen Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması Biyogüvenlik Protokolü'nü kabul etmiş durumdadır. Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Anlaşması gereğince hazırlanan Protokol, 130'dan fazla ülke tarafından 29 Ocak 2000 tarihinde Fransa'da kabul edilmiştir. 11 Eylül 2003'te yürürlüğe giren bu protokolün amacı insan sağlığı üzerindeki riskler göz önünde bulundurularak ve özellikle sınır ötesi hareketler üzerinde odaklanarak, biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilir kullanımı üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilecek ve modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilmiş olan değiştirilmiş canlı organizmaların güvenli nakli, muamelesi ve kullanımı alanında yeterli bir koruma düzeyinin sağlanmasına katkıda bulunmaktır. 2002 yılında GDO'ların risk değerlendirmelerini yapmak üzere Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) kurulmuştur. EFSA, GDO'ların insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası

olumsuz etkilerini bilimsel esaslar çerçevesinde değerlendirmekte ve son kararı ise Avrupa Birliği Komisyonu vermektedir (Çetiner ve Budak, 2007). Buna göre, AB içerisinde satılacak olan GD ürünlerin tüketicinin seçme özgürlüğünün sağlanması adına etiketlenmesi gerekmektedir. Avrupa Komisyonu'nun EC 1829/2003 ve EC 1830/2003 numaralı yönetmeliklerine göre "Gıda ve yem kullanım amaçlı GDO'lar, GDO içeren veya GDO olan gıda ve yem, GDO'lardan üretilen veya GDO içeren bileşenlerden üretilen gıda ve yemlerin" piyasaya sürülmesini ve etiketlenmesini düzenlemektedirler. Bu yönetmeliğe göre ürünün içeriğinde ancak % 0.9'un üzerinde bir değerde GDO içermesi durumunda etiketlemesi zorunludur. Bu sınırın altındaki miktardaki karışımın tesadüfi veya teknik olarak önlenemeyecek bir durum olduğunu kabul etmektedir. Bunun yanı sıra bu düzenlemeler sadece AB pazarına girmesi onaylanan çeşitler için geçerlidir, onaylanmamış ürünlerin her ne miktarda ve şekilde olursa olsun piyasada bulunması kesinlikle yasaktır.

Ülkemizde ise GDO ile ilgili yasal düzenlemeler son yıllarda oluşturulmuştur. "Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerinin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik" 26 Ekim 2009 tarih ve 27388 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanmış ve 28 Nisan 2010 tarihinde ise yönetmelikte değişiklik yapılmıştır. Transgenik çeşitlerle ilgili risk değerlendirmesi yapan kuruluşların (EFSA, WHO, FAO) ve bilimsel araştırmalarının sonuçları (allerjenik ve toksijenik etki analizleri, genetik modifikasyonun stabilitesi, morfolojik ve agronomik özellikler, hedef dışı organizmalara etkisi vb.) ile farklı ülkelerde üretim ve tüketim durumlarını göz önünde bulundurarak belirli transgenik ürünlerle ilgili alınan Bilimsel Komite Kararları Bakanlıkça onaylanmıştır. Söz konusu Komite Kararına göre gıda ve yem ürünlerinin GDO'lu olarak değerlendirilmesi ve etiketlendirilmesi için GDO oranının % 0.9 eşik değerinden fazla olması gerekmektedir. Tanımlanmamış ve risk değerlendirmeleri yetkili kurullar tarafından yapılmamış yabancı genleri içeren ürünler için bu eşik değer % 0 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra 26 Mart 2010 tarihli ve 27533 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Biyogüvenlik Kanunu" nun esaslarına göre ülkemizde genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin Kurul tarafından piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı ve

GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaklanmıştır. 26 Ocak 2011 tarihinde ise Biyogüvenlik Kurulunun kararı ile Avrupa Birliği tarafından onaylanmış transgenik üç soya ırkının (GTS 40-3-2, A2704-12, MON 89788) hayvan yemi olarak ülkemize girişine izin verilmiştir.

Bu yasal düzenlemeler, sınırlamalara uygun, bilimsel esaslara dayalı, güvenilir ve onaylı belirleme/ölçüm tekniklerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

2.10. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TANISI

GD tarım ürünlerinin belirlenmesinde, aktarılan genin DNA dizisinin veya aktarılan genin nihai ürünü olan proteinin tanımlanmasına dayalı başlıca iki yaklaşım söz konusudur. Protein temelli immünokimyasal testlerden en yaygın kullanım alanına sahip olan ELISA yönteminde, özel bir proteine bağlanması için bir antikor ve ilgilenilen protein standardı ile karşılaştırılarak, reaksiyonun sonucunu bir renk ürünü olarak ölçülebilen, antikora bağlı bir enzim kullanılır. Laboratuvarlarda kullanılan bu yöntemin yanı sıra taşınabilirliği sayesinde tarlada veya ithal edilen ürünlerin yükleme veya boşaltma noktalarında da kullanım alanına sahip LFS’lerden (Lateral Flow Strips) de bahsetmek mümkündür (Holst-Jensen, 2009). Alternatif protein temelli yöntemler immunomagnetik elektrokimyasal sensörler, 2-boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrofotometresi kullanımını içermektedir. Proteine dayalı testler, ölçülebilir bir protein üretildiğinde pratik ve etkin bir analiz yöntemidir, ancak transgenlerin anlatımının ve translasyonunun düşük olduğu örneklerde yöntemin hassaslığından ve geçerliliğinden söz edilemez. Buna ek olarak, özellikle endüstriyel işlemler proteinlerin kolayca bozulmasına ve epitopların hasar görmesine sebep olabilir (Elenis ve diğ., 2008). Bu nedenle işlenmiş gıdalarda ELISA yöntemini kullanmak hatalı sonuçlara yol açabilir.

DNA temelli yöntemler, daha hassas ve güvenilir sonuçlar verdiği için genetiği değiştirilmiş ürünlerin analizinde sıkça tercih edilir (Holst-Jensen ve diğ., 2003). Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı spesifik bir DNA parçasının çoğaltılması ilkesine dayanan PCR tekniğidir.

2.10.1. DNA Temelli Analiz Yöntemleri

DNA temelli GDO analiz prosedürleri genellikle tarama, tanımlama ve miktar tayini olmak üzere üç aşamadan oluşur.

1) Tarama: Amaç bir ürünün GDO içerip içermediğini tespit etmektir. Sonucu pozitif ya da negatif olabilir. Çıkan sonucun kesin ve hatasız olduğundan emin olmak için kullanılan method çok hassas ve güvenilir olmalıdır.
2) Tanımlama: Bu aşamada amaç ürünün kaç farklı GDO içerdiğini ve bu içeriklerin onaylı GDO'lar olup olmadığını bulmaktır. GDO tanımlaması için spesifik dizi bilgisine ihtiyaç vardır.
3) Miktar tayini: Eğer bir üründe GDO varlığı belirlendiyse yönetmeliklere uygun miktarlarda olup olmadığını belirlemek için kantitatif analizler yapılır (Laura ve diğ., 2001).

Örneklerden yüksek kalitede ve saflıkta DNA izole etmek, GDO analizinin birinci adımıdır. DNA izolasyonu ekstraksiyon ve saflaştırma olmak üzere iki temel aşamadan meydana gelmektedir. DNA ekstraksiyonu hücrelerin parçalanması, hücresel nükleazların inaktivasyonu, DNA dışındaki nükleik asitlerin parçalanması ve DNA'nın geri kalan maddelerden ayrılması olarak özetlenebilir. Bu aşamada mekanik, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin hepsine ya da birkaçına başvururlur. DNA'nın saflaştırılması sırasında ekstraksiyon/çöktürme, kromotografi, santrifügasyon, affinite/bağlanma ayrımından en az iki veya daha fazlası kullanılır.

Ekstraksiyon ve saflaştırma sırasında kullanılan maddelerin bazıları sonraki analiz aşamalarında inhibitör görevi görebilirler. GDO analizlerinde elde edilen çözeltideki DNA miktarının ileriki basamaklar için yeterli olmasının yanında, spektrofotometrik nükleik asit ölçümünü etkileyen ve PCR'ı inhibe eden maddelerden de arınmış olması gereklidir (Terry ve diğ., 2002). PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları Tablo 2.4'de listelenmiştir.

Tablo 2.4: PCR inhibitörleri ve inhibisyon konsantrasyonları (Somma, 2006)

PCR inhibitörü	**Miktar**
SDS	> % 0.005
Fenol	> % 0.2
Etanol	> % 1
İzopropanol	> % 1
Sodyum asetat	> 5 mM
Sodyum klorür	> 25 mM
EDTA	> 0.5 mM
Hemoglobin	> 1 mg/ml
Heparin	> 0.15 i.u./ml
Üre	> 20 mM

Gıdaların işlenmesinde kullanılan mekanik stres, yüksek sıcaklık, çeşitli pH varyasyonları, enzimatik aktivite ve fermentasyon gibi uygulamalar DNA'nın hidrolizine, oksidasyonuna veya deaminasyonuna neden olarak birincil yapısına etki eder. Bu işlemler gıdanın homojenitesini arttırmasına rağmen, DNA'nın önemli ölçüde degredasyonuna veya kaybına yol açar (Gryson, 2010). Gıdalar, değişik özellikteki birçok içerikten oluşan kompleks yapılardır. Her bir içeriğin yapısı, geçirdiği işlem basamaklarına bağlı olarak, ekstraksiyonun etkinliğini değiştirmektedir.

Bitkilerden DNA izole etmek için "setiltrimetilamonyum bromür" (CTAB) ile DNA izolasyon yöntemi, DNA bağlayıcı silika kolon esasına dayanan ticari kitler veya bu iki yöntemin kombinasyonu kullanılmaktadır. CTAB metodu ilk kez 1980'de Murray ve Thompson (1980) tarafından geliştirilen ve yayınlandığından bu yana farklı modifikasyonlarıyla bitki ve bitki kökenli gıdalardan DNA izole etmek için yaygın olarak kullanılan etkin bir yöntemdir. Bitki hücreleri, düşük tuz konsantrasyonunda nükleik asitlerle çözünmez bir kompleks oluşturan iyonik deterjan CTAB ile parçalanabilirler. Bu koşullar altında polisakkaritler, fenolik bileşenler ve diğer kontaminantlar üst fazda kalır, böylece uzaklaştırılabilirler. DNA kompleksi tuz konsantrasyonunun artırılmasıyla çözülür ve DNA etanol veya izopropanol ile çöktürülür. Bu üç ana basamağın prensibi, hücre membranının parçalanması, genomik DNA'nın ekstraksiyonu ve çöktürülmesi olarak

tanımlanabilir (Somma, 2006). GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans laboratuvarı (EURL-GMFF), mısır ve soya gibi pek çok gıda türü için CTAB metodunun uygulanabilirliğini onaylamıştır (CRL-GMFF, 2007, 2008).

2.10.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

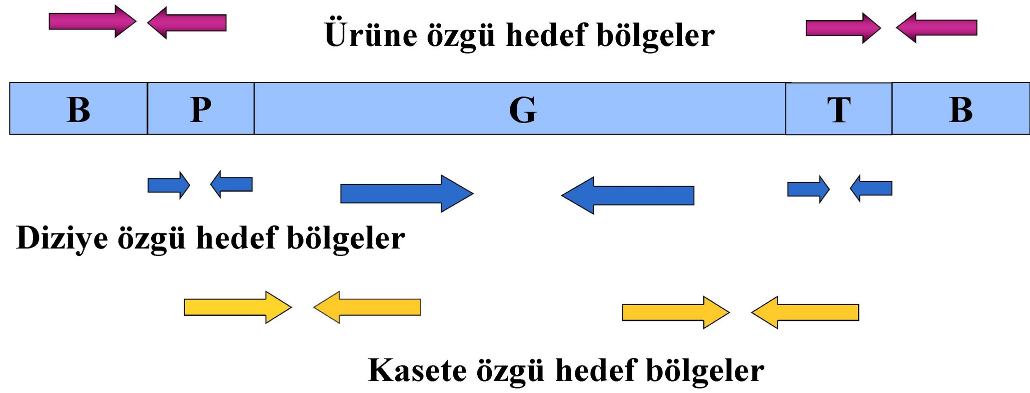
1985 yılında Kary Mullis ve arkadaşları tarafından bulunan bu teknik, iki primer (hedef dizinin her iki ucuna da komplementer sentetik oligonükleotitler) arasındaki hedef DNA parçasının milyonlarca kopyasının oluşturulmasına imkan tanır. Tekrarlanan bir seri kademeli termal döngüler boyunca DNA polimeraz enzimiyle çoğaltım gerçekleşir ve primer çifti arasındaki DNA dizilerinin hızlı bir şekilde çoğalması sağlanır.

Prensip olarak PCR, üç farklı sıcaklık derecesinin ardışık döngülerinden oluşan bir işlemdir. Bu döngüler boyunca hedef dizinin sayısı üssel olarak artar. İlk basamakta, kalıp dsDNA (çift zincir DNA) denatürasyon sıcaklığına (~94 ºC) ısıtılarak tek zincir haline getirilir. İkinci basamakta, primerlerin hedef dizilere bağlanması için sıcaklık 50-65 ºC' ye (GC içeriğine göre değişir) düşürülür. Üçüncü basamakta ise hedef diziye bağlanmış primerler optimum sıcaklıkta (72 ºC) genellikle *Thermus aquaticus* (Taq) polimeraz enzimi tarafından uzatılır. Primerlerin uzatılmasıyla hedef dizinin kopyası oluşturulmuş olur. DNA miktarına ve DNA parçasının uzunluğuna bağlı olarak döngüler 20-50 kez tekrar edilebilir (Somma ve Querci, 2010).

PCR amplifikasyonu sırasında hedef alınan bölgeye bağlı olarak, PCR'ın hassaslığı ve özgünlüğü değişiklik göstermektedir. Günümüzde kullanılmakta olan DNA temelli yöntemler özgünlükleri açısından 3 kategoride incelenebilir (Şekil 2.9):

1. Diziye (Elemente) özgü: Promotor, terminatör gibi düzenleyici dizilere ya da aktarılan özelliği taşıyan gene özgü bu yöntemde, PCR ürünü olarak bu elementlerden birine ait dizi çoğaltılır.
2. Kasete özgü: Kaset, düzenleyici dizilerden ve genden oluşmaktadır. Bu yöntemde PCR ile kaset içerisinde birden fazla farklı elementin birleştiği noktalar çoğaltılır.

3. Ürüne özgü: Ortaya çıkan her farklı üründe kasetin bitki genomunda yerleştiği bölüm diğerlerinden farklıdır. Bu yöntemde kasetin bitki genomuyla birleştiği bölüm PCR ile çoğaltılır. (Marmiroli ve diğ., 2008).



Şekil 2.9: Klasik bir gen kasetinin şematik gösterimi ve GDO analizinde kullanılan PCR kategorileri. *B*: bitki genomu, *P*: promotor, *G*: aktarılan gen, *T*: terminatör. Gen kaseti P-T arası bölgeleri içerir ve B'ye aktarılır.

Son olarak, geleneksel PCR'da elde edilen PCR ürünlerinin analizi için örnekler agaroz jel elektroforez sistemi ile görüntülenir. Agaroz jel elektroforezinde, jele yüklenen örnekler, jelin içinde büyüklüklerine göre ayrılır ve analiz edilebilir (Elenis ve diğ.,2008).

2.10.2.1. Tarama Amaçlı Kalitatif PCR

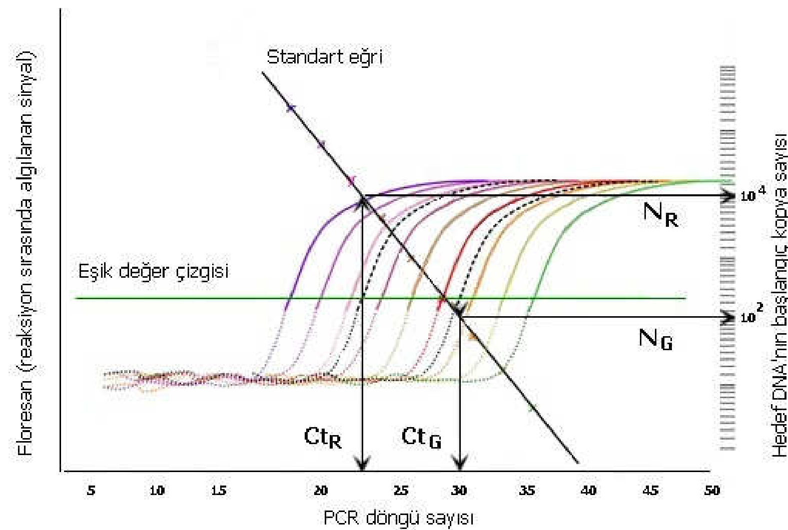
GDO içeriği tanımlanmak istenilen çalışmalarda, 'bitkiye özgü kalitatif PCR' GDO analizinin ilk basamağıdır. Bitkiye özgü PCR, izole edilen DNA'nın kalitesinden, PCR için uygunluğundan ve total DNA içinde GDO analizi yapılacak bitkinin DNA'sının varlığından emin olmak için gereklidir. Kullanılan hedef gen dizisi yalnızca hedef bitki türüne özgü olmalıdır (Holst-Jensen ve diğ., 2003). Lektin, zein, sad1 ve cruciferinA genleri sırasıyla soya, mısır, pamuk ve kanola bitkilerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılan hedef dizilere örnektir.

Bitki kaynaklı gıda maddelerinde, herhangi bir genetik modifiye girdinin tanımlanması 'transgene özgü kalitatif PCR' olarak adlandırılan tarama yöntemiyle mümkündür. Tarama amaçlı GDO analizinde, odaklanılan hedef diziler taranan grup için karakteristik diziler olmalıdır. CaMV 35S promotoru ve *A. tumefaciens* NOS

terminatörü, bugün marketlerde sunulan birçok GD üründe genetik kontrol elementleri olarak bulunmaktadır ve günümüzde tarama amaçlı GDO analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Elenis ve diğ., 2008).

2.10.2.2. Kantitatif 'Real time' (Gerçek zamanlı) PCR

PCR; üssel artış fazı, lineer faz ve durağan faz olmak üzere üç aşamadan oluşur. Geleneksel PCR'da bitiş noktasında oluşan son ürünün analizi yapılır ve miktarsal bir veri elde etme imkanı çok sınırlıdır. Son ürün analizlerinden farklı olarak bu PCR sistemleri, reaksiyonun gerçekleştiği zamanla eş zamanda reaksiyonu görüntüler. Ard arda gerçekleşen döngülerde üretilen PCR ürününün miktarı orantılı bir biçimde yayılan floresan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Eşik değerin üzerinde anlamlı bir sinyal oluşması için gerekli PCR döngüsünün sayısı bir ölçü olarak alınır ve eşik değer döngüsü (Ct) değeri olarak adlandırılır. Ct değeri, etkinliğin sürdüğü PCR evresi süresince ölçülür ve bu değer, hedef molekülün başlangıç miktarıyla ters orantılıdır (Şekil 2.10).

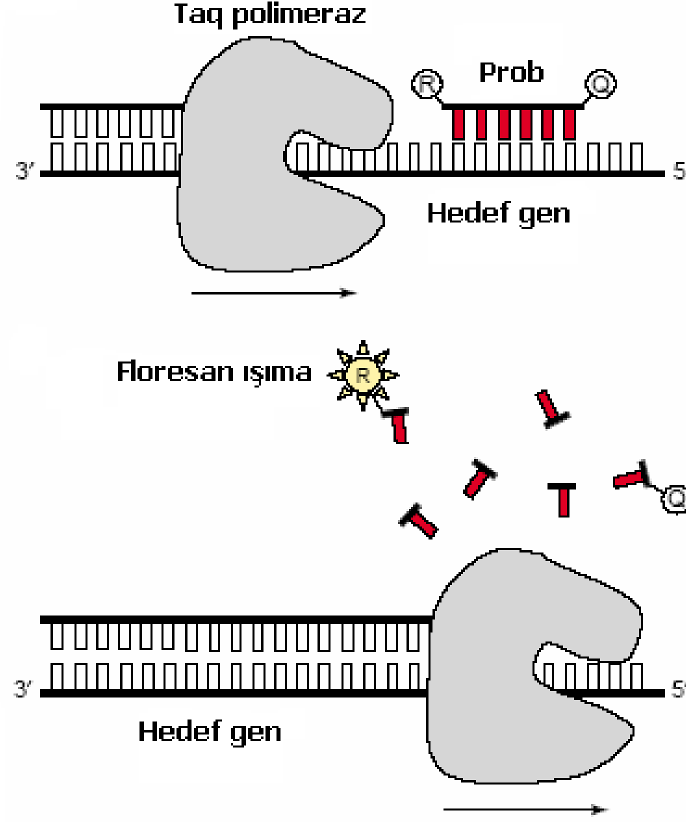


Şekil 2.10: 'Real time' PCR analizinde hedef DNA'nın başlangıç miktarı ve eşik değer döngüsü arasındaki ilişki. N_R: Referans genin başlangıç kopya sayısı, N_G: Yabancı genin başlangıç kopya sayısı, Ct_R: Referans genin eşik değer döngüsü, Ct_G: Yabancı genin eşik değer döngüsü (Holst-Jensen ve diğ., 2003)

'Real time' PCR tekniği ilk kez 1992'de Higuchi ve arkadaşları tarafından dsDNA'ya bağlanma özelliğindeki bir boya olan etidyum bromür (EtBr) kullanılarak geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda yöntemin hassasiyetini geliştirmeye

yönelik, çoğalma reaksiyonunu oluşturmak ve izlemek için kullanılan birçok kimyasal ve oluşan sinyali izlemek için kullanılan birçok cihaz piyasada yerini almıştır. Higuchi ve arkadaşları, EtBr yerine, daha az toksik, daha özgün, daha duyarlı floresan bir dsDNA boyasını kullanmıştır. SYBR Green I tabanlı ‘real time’ PCR sistemlerinin en önemli zorluğu, bu molekülün özgün olmayan DNA’yı ve primer dimerlerini de tanıma ihtimalidir. Bu problemin üstesinden gelmek ve özgün olmayan DNA’nın PCR ürünlerinden dolayı oluşan bu miktar tayin bileşenini hesaplamadan çıkarmak için erime eğrisi analizi yapmak mümkündür (Gasparic ve diğ., 2010).

Özgün prob yöntemleri özgün olmayan dsDNA boyalarına göre daha güvenilir sonuçlar verdiği için GDO analizlerinde daha çok tercih edilir. FRET (“fluorescene resonance energy transfer”) probları, moleküler boncuklar ve scorpion problar GDO analizinde kullanılan özgün prob yöntemleridir. Ancak en yaygın kullanılan özgün prob yöntemi TaqMan ya da 5′-ekzonükleaz olarak adlandırılan yöntemdir. TaqMan probu genellikle 20-30 baz uzunluğunda bir oligonükleotiddir. Kalıp DNA zincirinde iki primer arasında kalan bölgedeki belirli bir nükleotid dizisine bağlanacak şekilde tasarlanırlar. 5′ ucunda haberci (FAM, VIC, TET, JOE) floresan boya, 3′ ucunda baskılayıcı (TAMRA) boya bulundurur. 3′ ucu bloke olduğu için prob primer gibi uzamaz. Prob bozulmadan önce haberci boya, baskılayıcı boyaya yakınlığı nedeniyle baskılanır böylece ışıma meydana getirmez. Eğer prob hedef DNA ile hibridize olmuş durumda ise, çoğaltımın uzama evresinde Taq polimerazın 5′-3′ ekzonükleaz aktivitesi probu ayırır. Ayrılma, baskılamanın etkisini azaltır. Buna bağlı olarak haberci boyanın floresan ışıması, oluşan ürün miktarının ölçüsü haline gelir. PCR ürününün birikimi haberci boya floresanında artış görüntülenmesine yol açar (Şekil 2.11).



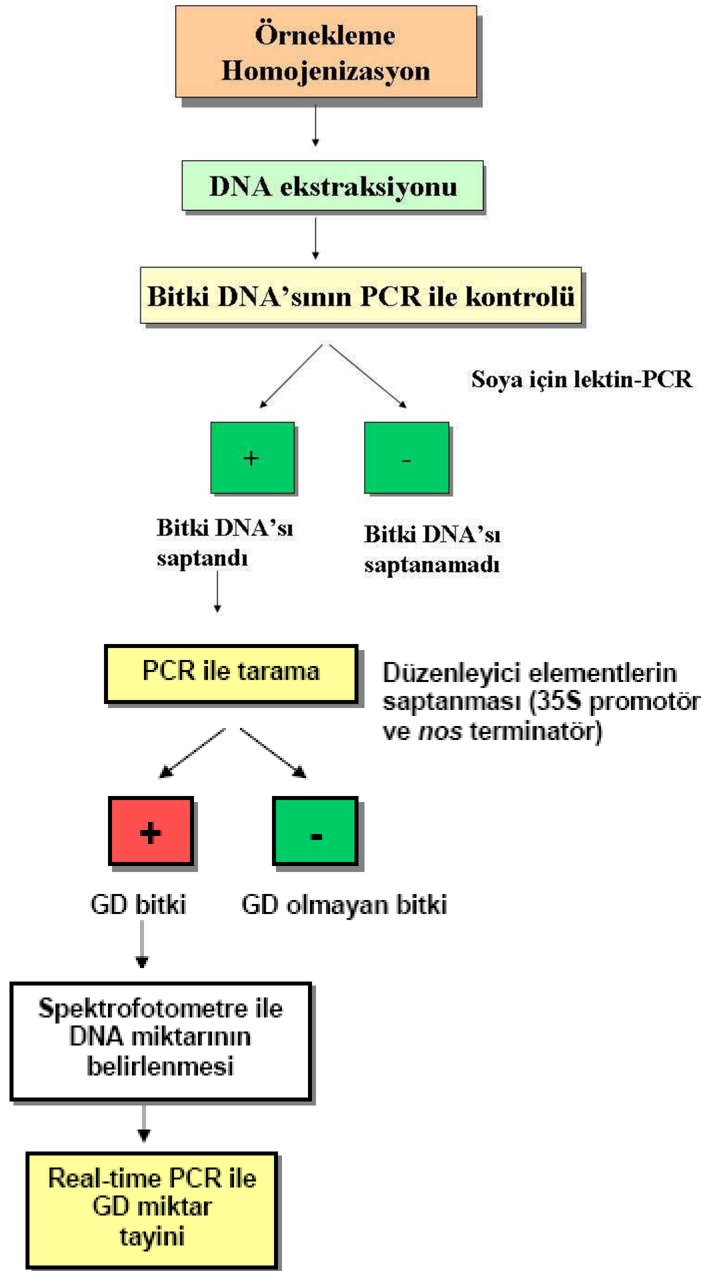
Şekil 2.11: TaqMan yönteminde Taq polimerazın 5′-3′ ekzonükleaz aktivitesiyle probun ayrılması sonucu haberci ve baskılayıcı boyanın birbirinden uzaklaşmasıyla floresan ışımanın gerçekleşmesi. *R*: Haberci boya, *Q*: Baskılayıcı boya (Mocellin ve diğ., 2003)

Bir örnekteki GD DNA içeriği, ürünün toplam miktarında genetik değişikliğe uğramış materyalin miktarı ile ifade edilebilir. Bu değeri ‘real time’ PCR’a dayalı bir sistemde saptamak için endojen (iç) referans genin DNA dizi kopyasının ve spesifik hedef DNA dizi kopya sayısının ölçülmesi gerekir. Referans olarak seçilen gen bitki türüne özel, haploid genom başına tek bir kopya, aynı türün farklı hatlarında değişmeden kalan ve analiz edilen hedef DNA gibi çoğalabilecek özellikte olması gerekmektedir. Bir örneğin GD DNA içeriği, doğrudan Ct değerlerinin karşılaştırılmasıyla (ΔCt metod) veya standart eğriden elde edilen kopya sayılarının karşılaştırılmasıyla belirlenebilir. Fakat ΔCt yöntemi, örneğe ait referans ve hedef gen aynı etkinlikle çoğalmışsa kullanılır. Standart eğri yöntemi ise böyle bir koşul ile sınırlandırılmaz. Bu yöntemde, referans gene özgü bir ölçüm sistemi içeren eğri ve GD hedefe özgü bir ölçüm sistemi içeren eğri oluşturulur. Her

örnek için hedef ve referans gen miktarı, standart eğriyle ara değer bulunarak belirlenir (Holst-Jensen, 2003). Daha sonra GD DNA içeriği, GD hedef dizi miktarı ve referans gen dizi miktarının oranı olarak hesaplanır.

GD DNA içeriği (%) = GD / referans x 100

'Real time' PCR analizlerinde yüksek hassasiyette ve özgünlükte sonuç alınması, standart eğri oluşturmak için kullanılan sertifikalı referans materyallere (SRM) bağlıdır. SRM'ler, analitik ölçümlerin kalite güvencesi için gerekli olan araçlardır. Pozitif ve negatif kontrollerin uygun referans materyalleri, analitik süreçlerin validasyonu, laboratuvar ve methodların performansını değerlendirmek için temel oluşturur (Ahmed, 2002). SRM'ler, ağırlık/ağırlık esasına göre çeşitli yüzdelerde karıştırılmış olan GD ve GD olmayan ürünlerden oluşan, toz haline getirilmiş bitki materyalleridir (Trapmann, 2002). Her GD çeşidin, özgün bir referans materyali bulunmaktadır. Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü (IRMM) tarfından Avrupa Komisyonu Ortak Araştırma Merkezi (JRC) işbirliği ile belli sayıda referans materyali piyasaya sunulmaktadır. Bu SRM'leri % 0, % 0.1, % 0.5, % 1, % 2 ve % 5 oranında GD içeren seriler halinde bulmak mümkündür.



Şekil 2.12: Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEK TOPLANMASI

Bu tez kapsamında Türkiye pazarında satışı yapılan, soya içeren gıda örnekleri kullanıldı. Farklı işlenmişlik seviyelerine sahip gıda türleri ve markaları analiz edilmek üzere İstanbul'daki çeşitli marketlerden satın alındı. Kullanılan gıda örnekleri Tablo 3.1'de listelenmiştir.

Tablo 3.1: GDO analizi için kullanılan örnekler

Örnek No	Ürün
Örnek 1	Soya unu
Örnek 2	Soya kıyması
Örnek 3	Soya eti
Örnek 4	Soya sütü
Örnek 5	Soya kreması
Örnek 6	Soya kahvesi
Örnek 7	Soya filizi-1*
Örnek 8	Soya filizi-2*
Örnek 9	Tofu

*1 ve 2 ifadeleri farklı markaları göstermektedir.

3.2. DNA İZOLASYONU

Örneklerden, CTAB yöntemi ve ticari kit olmak üzere iki farklı yöntemle DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kalitatif PCR analizlerinde kontrol grubu olarak, kantitatif PCR analizinde ise standart eğri oluşturmak amacıyla kullanılacak olan Sertifikalı Referans Materyallerden [ERM-410A (% 0), ERM-410B (% 0.5), ERM-410C (% 1), ERM-410D (% 2)] CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İşlemlerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla DNA izolasyonu her örnek için üçer kez tekrar edildi. Olası bir kontaminasyonu engellemek üzere izolasyonda kullanılacak malzemeler ve çözeltiler (CTAB

tamponu, CTAB çöktürme tamponu ve 1.2 M NaCl) 121ºC'de 1.2 atm basınçta 15 dakika bekletilerek otoklavlandı. İşlem sırasında ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riskine karşı bir tüpte örnek yerine su kullanılarak (izolasyon kontrolü) işlem basamakları uygulandı.

3.2.1. CTAB Yöntemi ile DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, işlenmiş gıda örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmek üzere Somma (2006)'da uygulanan modifiye edilmiş CTAB DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan CTAB tamponu, CTAB çöktürme tamponu ve NaCl çözeltisinin içerikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: CTAB yöntemi ile DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
CTAB tamponu	20 g/l CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür), 1.4 M NaCl (Sodyum klorür), 0.1 M Tris-HCl (Tris-Hidroklorür) (Sigma, T5816) , 20 mM Na_2EDTA (Etilen daimin tetraasetik asit disodyum) (Sigma, E5134)
CTAB çöktürme tamponu	5 g/l CTAB (Sigma, H5882), 0.04 M NaCl
NaCl	1.2 M NaCl (Riedel, D30926), distile su içinde

CTAB yöntemi ile DNA izolasyon prosedürü

100 mg gıda örneğine uygulanan homojenizasyon işleminden sonra elde edilen homojenat 1.5 ml'lik steril santrifrüj tüpüne aktarılır.

1. 300 µl dH_2O eklenir ve ters düz edilerek karıştırılır.
2. 500 µl CTAB tamponu eklenir ve ters düz edilerek karıştırılır.
3. 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma, P2308) eklenir, 65 ºC'de 90 dakika inkübe edilir.
4. 20 µl RNaz A (10 mg/ml) (Sigma, R4642) eklenir, çalkalanır ve 65 ºC'de 10 dakika inkübe edilir.
5. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edilir.
6. Süpernatant 500 µl kloroform (Sigma, C2432) içeren santrifüj tüpüne transfer edilir ve 30 saniye çalkalanır.
7. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edilir.

8. Üst fazın 500 µl'si 500 µl kloroform içeren santrifüj tüpüne aktarılır ve çalkalanır.
9. 16000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edilir.
10. Üst faz temiz tüplere transfer edilir.
11. İki hacim (v/v) CTAB çöktürme solüsyonu eklenir ve pipetaj yapılır.
12. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
13. 16000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edilir.
14. Süpernatant atılır.
15. Pellet 350 µl 1.2 M NaCl içersinde çözülür.
16. 350 µl kloroform eklenir ve 30 saniye çalkalanır.
17. 16000 *xg*'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edilir.
18. Üst faz temiz tüplere transfer edilir.
19. 0.6 hacim (v/v) izopropanol (Sigma, I9516) eklenir ve çalkalanır.
20. 16000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilir.
21. Süpernatant atılır.
22. 500 µl %70'lik (v/v) etanol (Sigma, E7023) eklenir ve dikkatlice çalkalanır.
23. 16000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilir.
24. Süpernatant atılır.
25. Pellet kurutulduktan sonra 100 µl steril dH_2O içinde çözülür.

3.2.2. Kit ile DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu "Foodproof GMO Sample Preparation Kit" (Biotecon Diagnostic, S 400 06) kullanılarak üreticinin önerdiği işlemlere göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. 200 mg homojenat, 1.5 ml lik steril santrifüj tüpüne aktarılır.
2. 1 ml ekstraksiyon tamponu eklenir.
3. 30 saniye karıştırılır.
4. 80 ºC'de 30 dakika inkübe edilir.
5. 12000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Bir başka 1.5 ml'lik tüpe 400 µl bağlama tamponu eklenir.
7. 600 µl supernatant bağlama tamponuna eklenir ve iyice pipetaj yapılır.
8. 80 µl Proteinaz K eklenir ve iyice pipetaj yapılır.

9. 72 ºC'de 10 dakika inkübe edilir.
10. 200 µl izopropanol eklenir ve pipetaj yapılır.
11. Karışımın 650 µl si filtreli toplama tüpüne aktarılır.
12. 5000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilir.
13. Tüpün dibinde biriken sıvı atılır.
14. 450 µl yıkama tamponu eklenir.
15. 5000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilir.
16. Tüpün dibinde biriken sıvı atılır ve 14-15. basamaklar tekrarlanır.
17. Tüpün dibinde biriken sıvı atılır.
18. Filtreli toplama tüpü maksimum hızda 10 saniye santrifüj edilir.
19. Filtre 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne geçirilir.
20. 50 µl 70 ºC'de ısıtılmış elüsyon tamponu eklenir.
21. 15-25 ºC'de 5 dakika bekletilir.
22. 5000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilir.

3.3. DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

İzole edilen DNA'lar spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler kullanılarak analiz edildi.

3.3.1. Spektrofotometrik Analiz

Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların miktarının hesaplanması ve saflıklarının kontrol edilmesinde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. DNA'ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre yapıldı. Çift iplikli DNA molekülü için 1 optik densite (O.D.) değeri 50 µg/ml'ye karşılık geldiği için DNA'ların konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA } (\mu g/ml) = A_{260} \text{ x sulandırım kat sayısı x } 50$$

Saflık kontrolü için ise DNA'nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığını soğurma değerlerinin oranı (A_{260}/A_{280}) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise genomik DNA'nın saf olduğu kabul edilir (Maniatis ve diğ., 1982). Belirtilen

değer aralığından düşük veya yüksek orana sahip DNA'ların saflığından söz edilemez.

3.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen genomik DNA'ların kalitatif analizi % 1'lik, tarama amaçlı PCR'ların analizi % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanıldı. % 1'lik jel için 0.4 g, % 2'lik jel içinse 0.8 g agaroz (Sigma, A5073), stok 50X TAE tamponunun (Tablo 3.3) sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml 1X TAE tamponuna eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika süre ile çözündürüldü.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
50X TAE tamponu	2 M Tris bazı (Sigma, T8524), %0.0571 Glasiyal asetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (pH 8.0)
10 mg/ml EtBr	10 mg EtBr, 1 ml distile su içinde
6X Yükleme tamponu	100 mM EDTA (Ph 8.0), %1 SDS, %60 Gliserol, %0.03 Bromofenol mavisi, %0.03 Ksilen siyanol FF

Oda sıcaklığında yaklaşık 60 ºC'ye kadar soğutulan jele son konsantrasyonu 0.5 ng/µl olacak şekilde 2 µl EtBr eklenip, karıştırıldı. Jel, tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasetine dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaşan agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µl örnek, 1µl yükleme boyası (Fermentas, R0611) ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklenerek 70 V sabit gerilimde, markır (Fermentas, SMO244 ve SM0103) ile birlikte 45 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör (Vilber Lourmat, ECX-F26.M) ile görüntülendi.

3.4. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ

Soyaya özgü lektin geni, CaMV 35S promotoru ve NOS terminatörü kalitatif PCR'la belirlendi. İşlemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla her örnek için PCR analizleri üçer kez tekrar edildi. Ayrıca yine bu amaç doğrultusunda her reaksiyon için pozitif, negatif ve kalıpsız kontrol grupları kullanıldı. Kullanılan kontroller aşağıda açıklanmıştır.

Pozitif kontrol: DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonunun verimliliği ölçmek için hedef diziyi içerdiği bilinen bir örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı. Lektin genine özgü PCR için geleneksel soyadan izole edilmiş DNA, 35S ve NOS PCR'ı içinse GDO içeriği bilinen Sertifikalı Referans Materyallerden (% 0.1-2 GD soya) izole edilmiş DNA pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Negatif kontrol: Primer özgünlüğünü ve reaksiyon hassasiyetini ölçmek için hedef diziyi içermediği bilinen bir DNA negatif kontrol olarak kullanıldı. Lektin genine özgü PCR için mısırdan izole edilen DNA, 35S ve NOS bölgelerine özgü PCR analizleri içinse GDO içermediği bilinen SRM'den (% 0 GD soya) izole edilmiş DNA negatif kontrol olarak kullanıldı.

Kalıpsız kontrol: Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında hedef nükleik asit dizisini taşıyan bir kontaminasyonun oluşması riskine karşı her PCR için DNA içermeyen bir örnek kalıpsız kontrol olarak kullanıldı.

3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Soyaya Ait Lektin Geninin Çoğaltılması

Lektinler; glikoprotein, glikolipid ve polisakkaridlerin glikanlarına bağlanma özelliği gösteren proteinlerdir. Bağlanma özellikleri sayesinde hücre içi, hücreler arası veya organizmalar arası tanıma molekülleri olarak görev yaparlar (Chrispeels ve diğ., 1991). Lektinler çoğu bitkide, özellikle baklagil tohumlarında, yoğun olarak bulunmaktadır. Gelişmekte olan tohumun kotiledonlarındaki vakuollerde yüksek seviyede (toplam proteinin %1-%8'i), embriyonik akslarında daha düşük seviyelerde depolanmaktadır. Lektinler, diğer tohum depo proteinleriyle birlikte tohumun gelişimi sırasında sentezlenir. Hem depo proteinleri hem de lektinler, çimlenme ve filizin gelişimi sırasında amino asit sağlamak üzere yıkılırlar. Tohumda bol miktarda bulunmalarının dışında kök, gövde, yaprak ve rizom gibi bitkinin vejetatif organlarında da az çok bulunmaktadır.

Bitki lektinleri oldukça heterojen protein grupları olarak görülmektedir çünkü karşılaştırmalı biyokimyasal çalışmalar, biyokimyasal/fizikokimyasal özelliklerine, moleküler yapılarına, karbonhidrat bağlama özelliklerine ve biyolojik aktivitelerine

bağlı olarak her birinin diğerinden farklı olduğunu işaret etmektedir. Soya tohumundaki lektin geni biyokimyasal ve moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Soya lektin proteini toplam tohum proteininin %0.6-%5'ini oluşturan ve tek bir gen (*Le 1*) tarafından kodlanan 120 kilodalton'luk tetramerik bir glikoproteindir (Philip ve diğ., 1998) .

Le 1 geni, soya bitkisinin PCR'la tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir hedef dizidir. Soyaya özgü endojen bir gen olan lektin varlığının belirlenmesi, örneklerde soya DNA'sının varlığından ve izole edilen DNA'nın kalitesinden emin olmak için gereklidir. Bunun için lektin genine özgü GMO3 ve GMO4 primerleri (Querci ve Mazzara, 2006) kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.4). Çoğaltılan DNA'nın soyaya ait olduğu, % 2'lik agaroz jel elektroforezinde gözlenen 118 bç büyüklüğündeki lektin spesifik bandı ile doğrulanır. Lektin PCR'ı için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.5'de, kullanılan PCR programı Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.4: Lektin primerleri ve dizileri

Primer ismi	Nükleotid dizisi (5′-3′)	Ürün boyutu (bç)
GMO3	GCCCTCTACTCCACCCCCATCC	118
GMO4	GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	

Tablo 3.5: Lektin genine özgü PCR analizinin reaksiyon karışımı

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	17.3	
10X PCR Tampon	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
10 mM dNTP	0.5	0.2 mM
10 µM ileri primer	0.6	0.24 µM
10 µM geri primer	0.6	0.24 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (50 ng/µl)	1	2 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.6: Lektin genine özgü PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 °C 63 °C 72 °C	30 sn 30 sn 30 sn	40
Son Uzama	72 °C	3 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	

3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile CaMV 35S Promotor ve NOS Terminatör Bölgelerinin Çoğaltılması

Genetiği değiştirilmiş gıdaların çoğu CaMV'a ait 35S RNA'yı şifreleyen genin promotorunu (P-35S) ve *Agrobacterium tumefaciens*'e ait nopalin sentaz geninin terminatörünü (T-Nos) içeren plazmidlerle transforme edilmiştir (Elenis ve diğ., 2008). Bu nedenle bitki kökenli gıdalarda, yabancı genlerin tarama yöntemiyle tanımlanmasında P-35S ve T-Nos yaygın olarak kullanılan hedef dizilerdir. Transgenik soyalar arasında piyasada en yaygın olarak bulunan "RoundUp Ready" çeşidini belirlemeye yönelik olan bu çalışmada, GMDD (GMO Detection Method Database, http://gmdd.shgmo.org)'den edinilen gen kaset bilgileri doğrultusunda ilgilenilen transgenikte de 35S ve NOS bölgelerinin bulunması nedeniyle, tarama PCR'ı için bu diziler kullanılmıştır.

Soya içeren ürünlerde yapılan bu tarama çalışmasında, 35S promotorunun saptanması için p35S-cf3/p35S-cr4 primer çifti (Querci ve Mazzara, 2006), NOS terminatörünün saptanması için ise tNOS 2-5′/tNOS 2-3′ primer çiftleri (Öztürk, 2011) kullanıldı (Tablo 3.7). 35S bölgesinin varlığı 123 bç, NOS bölgesinin varlığı ise 151 bç büyüklüğündeki bantların % 2'lik agaroz jel elektroforezinde gözlenmesiyle doğrulandı. 35S promotoruna özgü PCR için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.8'de, kullanılan PCR programı Tablo 3.9'da verilmiştir. NOS terminatör bölgesine özgü PCR için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.10'da, kullanılan PCR programı Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.7: CaMV P35S ve NOS primerleri ve dizileri

Hedef	Primer	Nükleotid dizisi (5′-3′)	Ürün boyutu (bç)
35S promotor bölgesi	**P35S-cf3** **P35S-cr4**	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	123
NOS terminatör bölgesi	**tNOS 2-5′** **tNOS 2-3′**	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT	151

Tablo 3.8: CaMV 35S promotor bölgesine özgü PCR analizinin reaksiyon karışımı

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	16.9	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dNTP	1	0.08 mM
10 µM ileri primer	0.5	0.2 µM
10 µM geri primer	0.5	0.2 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (100 ng/µl)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.9: CaMV 35S promotor bölgesine ait PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 °C 60 °C 72 °C	30 sn 30 sn 30 sn	35
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	

Tablo 3.10: NOS terminatör bölgesine özgü PCR analizinin reaksiyon karışımı

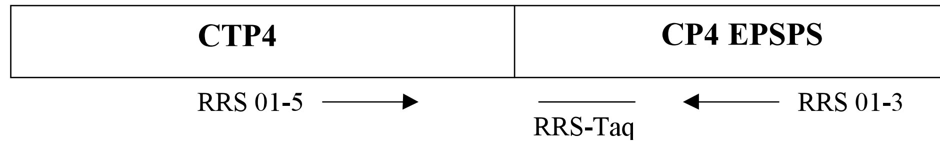
Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	18	
10X PCR Tamponu	2.5	1X
25 mM $MgCl_2$	2.5	2.5 mM
2 mM dNTP	0.3	0.024 mM
10 µM ileri primer	0.3	0.12 µM
10 µM geri primer	0.3	0.12 µM
Taq DNA polimeraz	0.1	0.2 U
DNA (100 ng/µl)	1	4 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.11: NOS terminatör bölgesine ait PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon **Bağlanma** **Uzama**	95 °C 61 °C 72 °C	30 sn 30 sn 30 sn	35
Son Uzama	72 °C	5 dk	1
Bekleme	4 °C	∞	

3.5. KANTİTATİF 'REAL TIME' PCR ANALİZLERİ

'Real time' PCR analizleri GD miktarının analizi için "RoundUp Ready" çeşidinde bulunan, kasete özgü CTP4 bölgesi ve CP4 EPSPS geni arasındaki dizi (Şekil 3.1) hedef alınarak TaqMan probu ile gerçekleştirildi (Tablo 3.12). Endojen gen olarak ise lektin ve bu gene özgü primer ve TaqMan prob setleri kullanıldı (Tablo 3.12).



Şekil 3.1: "RoundUp Ready" soya çeşidinin transgene özgü kantitasyonunda kullanılan primerlerin ve probun bağlandığı bölgeler. RRS 01-5: ileri primer, RRS-Taq: prob, RRS 01-3: geri primer

Kantitatif analizler, FastStart TaqMan Probe Master (Roche Applied Science, 04673409001) kullanılarak Stratagene Mx3005P QPCR sisteminde gerçekleştirildi. PCR koşulları Kuribara ve diğ. (2002) çalışmasında belirtildiği gibi uygulandı. Her örnek için GDO ve endojen referans gen miktarları, uygun olarak hazırlanmış standart eğrilerle ölçüldü. GDO analizi için oluşturulan standart eğri, üç farklı konsantrasyonda (% 0.1; 0.5; 1) GDO içeriğine sahip "RoundUp Ready" SRM'ler kullanılarak oluşturuldu.

Farklı bitki türlerinden (mısır, soya, patates) elde edilmiş gıda içerikleri (yağ, un) tek bir gıda örneğinde aynı anda bulanabilir. Bu nedenle analiz edilecek olan gıdaların içerdiği soya miktarının belirlenmesi için dört farklı konsantrasyonda (%1; 10; 50; 100) soya DNA'sı içeren örnekler hazırlandı. Farklı konsantrasyonda soya örnekleri, sertifikalı referans materyallerden izole edilen % 100 soya DNA'sı ve *Hordeum vulgare* L. cv. Tokak varyetesinden (Altınova Tarım İşletmeleri Müdürlüğü, Kadıhan/Konya) izole edilen % 100 arpa DNA'sı içeren örneklerin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla elde edildi.

Bunlara ek olarak işlemin güvenilirliğini test etmek ve deneysel hataları önlemek için her primer/prob seti için kalıpsız negatif kontrol kullanıldı ve örnekler çift tekrarlı yüklendi. 'Real time' PCR için gerekli reaksiyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.13'de, kullanılan PCR programı ise Tablo 3.14'de verilmiştir.

Tablo 3.12: 'Real time' PCR analizi için kullanılan primer ve prob setleri

Hedef	**Primer/ Prob**	**Nükleotid dizi (5′-3′)**	**Ürün boyutu (bç)**
Lektin geni	Le1n02-5 Le1n02-3 Le1-Taq	GCCCTCTACTCCACCCCCA GCCCATCTGCAAGCCTTTTT FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA	118
CTP4-CP4 EPSPS	RRS 01-5 RRS 01-3 RRS-Taq	CCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGG GACTTGTCGCCGGGAATG FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA	121

Tablo 3.13: 'Real time' PCR analizi reaksiyon karışımı

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Steril dH_2O	8.8	
TaqMan Universal mastermix	12.5	
10 µM ileri primer	1.25	0.5 µM
10 µM geri primer	1.25	0.5 µM
25 µM prob	0.2	0.2 µM
DNA (50 ng/µl)	1	2 ng/µl
Toplam	**25**	

Tablo 3.14: 'Real time' PCR programı

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon ve aktivasyon	95 °C	10dk	1
Denatürasyon **Bağlanma ve Uzama**	95 °C 60 °C	30sn 1dk	45

4. BULGULAR

4.1. DNA İZOLASYONU, MİKTARI VE SAFLIĞI

Marketlerden toplanan dokuz gıda örneğinin tamamından (soya eti, soya unu, soya kıyması, soya filizi-1, soya filizi-2, soya kahvesi, soya sütü, soya kreması, tofu) CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4.1A). Soya eti örneğinden, Somma (2006)'da bildirilen CTAB yönteminde herhangi bir modifikasyon yapılmaksızın başarıyla DNA izole edildi (Şekil 4.1). Soya eti haricindeki tüm gıda örneklerine ise DNA izolasyonu amacıyla kullanılan CTAB yönteminin farklı aşamaları için modifikasyonlar uygulandı. Bu uygulamaların DNA izolasyonunun başarısı üzerindeki etkileri incelendi. İzolasyon yöntemine dair modifikasyonlar gıda örneğine özgün olarak uygulandı.

Soya unu örneğinde Somma (2006)'da bildirilen CTAB yöntemi ile DNA izolasyon prosedürünün uygulanmasından sonuç alınamaması nedeniyle ürüne özgü çeşitli modifikasyonlar yapıldı. Hücre duvarını, hücre ve nükleus membranını parçalayarak DNA'nın açığa çıkmasına neden olan CTAB tamponu ve DNA'nın çözünmesi amacıyla kullanılan NaCl uygulaması aşamasında miktar değişiklikleri yapıldı. Yüksek oranda karbonhidrat, yağ ve protein içeriğine sahip soya unundan izole edilen DNA'yı bu bileşenlerden tam olarak arındırmak amacıyla kloroform aşaması 3 kez uygulandı. Bu uygulamaların etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1: Soya unundan CTAB ile DNA izolasyonu gerçekleştirmek için yapılan modifikasyonların DNA izolasyonuna etkisi

	Orijinal CTAB yöntemi	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3
Başlangıç miktarı	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
CTAB (2. aşama)*	500 µl	500 µl	1000 µl	500 µl
NaCl (15. aşama)*	350 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Kloroform aşaması	2 kere	2 kere	3 kere	3 kere
Agaroz jel elektroforezi sonuçları				

*** CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu prosedüründeki (Bkz 3.2.1) işlem basamakları gösterilmektedir.**

İzole edilen DNA'nın agaroz jel elektroforez görüntüsündeki bandın yoğunluğu esas alınarak, yapılan uygulamalardan üçüncüsünde arttırılan NaCl miktarının ve üçüncü kez tekrar edilen kloroform aşamasının soya unundan DNA izolasyonunu olumlu yönde etkilediği belirlendi. Diğer uygulamaların ise belirgin bir etkisinin olmadığı gözlendi.

Soya kıymasına Somma (2006)'da bildirilen prosedürün uygulanması sonucu, yeterli miktarda DNA izole edilemedi. Soya örneğinin başlangıç miktarında ve buna bağlı olarak eklenen distile su miktarında değişiklikler yapıldı. Hücreleri daha iyi parçalamak amacıyla CTAB ve DNA çökeltisi oluşumunu sağlayan CTAB çöktürme tamponu ile ilgili uygulamalarda da miktar değişiklikleri yapıldı. Bu uygulamaların etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: Soya kıymasından CTAB ile DNA izolasyonu gerçekleştirmek için yapılan modifikasyonların DNA izolasyonuna etkisi

	Orijinal CTAB yöntemi	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3
Başlangıç miktarı	100 mg	100 mg	200 mg	200 mg
dH_2O (1. aşama)*	300 µl	600 µl	600 µl	600 µl
CTAB (2. aşama)*	500 µl	1000 µl	500 µl	500 µl
CTAB çöktürme tamponu (11. aşama)*	2 hacim	4 hacim	4 hacim	2 hacim
Agaroz jel elektroforezi sonuçları				

*** CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu prosedüründeki (Bkz 3.2.1) işlem basamakları gösterilmektedir.**

Yapılan uygulamalardan örneğin başlangıç miktarını ve distile su miktarının arttırılmasıyla birlikte agaroz jel elektroforezinde yoğun bir bant görülmesi, başarılı bir şekilde DNA izole edildiğini işaret etti.

Soya filizi örnekleri, izolasyon basamaklarına geçmeden önce 10 dakika suda yıkandı. Somma (2006)'da bildirilen prosedürden sonuç alınamaması nedeniyle başlangıç miktarı, CTAB tamponu ve CTAB çöktürme tamponu ile ilgili aşamalarda değişiklikler yapıldı. Bu uygulamaların etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4.3'te verildi.

Tablo 4.3: Soya filizinden CTAB ile DNA izolasyonu gerçekleştirmek için yapılan modifikasyonların DNA izolasyonuna etkisi

	Orijinal CTAB yöntemi	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3
Başlangıç miktarı	100 mg	100 mg	200 mg	200 mg
CTAB (2. aşama)*	500 µl	1000 µl	1000 µl	500 µl
CTAB çöktürme tamponu (11. aşama)*	2 hacim	2 hacim	4 hacim	2 hacim
İzopropanol aşaması	bekletme yok	bekletme yok	5' bekletme	10' bekletme
Agaroz jel elektroforezi sonuçları				

*** CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu prosedüründeki (Bkz 3.2.1) işlem basamakları gösterilmektedir.**

CTAB ve CTAB çöktürme tamponlarının miktarlarında yapılan değişiklikler yeterli miktarda ancak düşük saflıkta DNA izolasyonuna neden oldu. Soya filizi örneğinin başlangıç miktarının arttırılması ve izopropanol aşamasında 10 dakika bekletilmesi sonucunda ise etkin bir şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

İşlenmişlik seviyesi yüksek örneklerden biri olan soya kahvesinde başlangıç miktarına yönelik yapılan değişiklikler sonuç vermedi. İşlenme aşamalarında parçalanmasına veya kaybedilmesine rağmen mevcut DNA'nın en etkili biçimde izole edilebilmesi için CTAB ve CTAB çöktürme tamponunun miktarları değiştirildi. Son olarak safsızlıklardan arındırılmış saf DNA'nın çöktürülmesi amacıyla kullanılan izopropanol aşamasında, 5-10 dakikalık kısa bekletmeler uygulandı. Bu uygulamaların etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4.4'te verildi.

Tablo 4.4: Soya kahvesinden CTAB ile DNA izolasyonu gerçekleştirmek için yapılan modifikasyonların DNA izolasyonuna etkisi

	Orijinal CTAB yöntemi	Uygulama 1	Uygulama 2	Uygulama 3
Başlangıç miktarı	100 mg	200 mg	300 mg	100 mg
CTAB (2. aşama)*	500 µl	1000 µl	1000 µl	500 µl
CTAB çöktürme tamponu (11. aşama)*	2 hacim	2 hacim	4 hacim	4 hacim
İzopropanol aşaması (19. aşama)*	bekletme yok	5' bekletme	10' bekletme	bekletme yok
Agaroz jel elektroforezi sonuçları				

*** CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu prosedüründeki (Bkz 3.2.1) işlem basamakları gösterilmektedir.**

Soya kahvesine uygulanan modifikasyonlara göre CTAB çöktürme tamponunun miktarının arttırılması sonucu agaroz jel elektroforezinde diğer gıda örneklerine göre yoğunluğu az, oldukça silik bir bant gözlendi.

Soya sütü veya soya kreması ve tofu gibi süt ürünlerinde, Somma (2006)'da bildirilen prosedürün uygulanması sonucu spektrofotometrik ölçümlerde DNA varlığı belirlendi ancak agaroz jel elektroforezinde net bir bant gözlenmedi. DNA izolasyonunun etkiliğini arttırmak ve fazla miktarda DNA izole edebilmek için analiz edilen örneklerin başlangıç miktarı arttırıldı. Modifikasyon öncesi izole edilen DNA miktarı tofudan daha düşük olan süt ve krema gibi sıvı örnekler DNA'nın daha iyi çökmesi için izopropanol aşamasında bekletildi. Bu uygulamaların etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.5: Soya sütü, soya kreması ve tofudan CTAB ile DNA izolasyonu gerçekleştirmek için yapılan modifikasyonların DNA izolasyonuna etkisi

	Orijinal CTAB yöntemi (süt&krema)	Uygulama 1 (süt&krema)	Orijinal CTAB yöntemi (tofu)	Uygulama 1 (tofu)
Başlangıç miktarı	100 mg	200 mg	100 mg	300 mg
İzopropanol aşaması (19. aşama)*	bekletme yok	20' bekletme	bekletme yok	bekletme yok
Agaroz jel elektroforezi sonuçları				

*** CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu prosedüründeki (Bkz 3.2.1) işlem basamakları gösterilmektedir.**

Süt ve süt ürünlerinde başlangıç miktarının arttırılmasının DNA izolasyonu üzerinde olumlu etkileri belirlendi. Tofu için başlangıç miktarının arttırılması sonucu jel elektroforezinde izlenebilir bant oluşumu ile ürüne özgü optimizasyon işlemi başarıldı. Süt ve krema ise izopropanol aşamasında 20 dakika bekletildikten sonra agaroz jelde gözlemlenemeyecek kadar düşük miktarda DNA'nın varlığına spektrofotometrik ölçümlerde rastlandı.

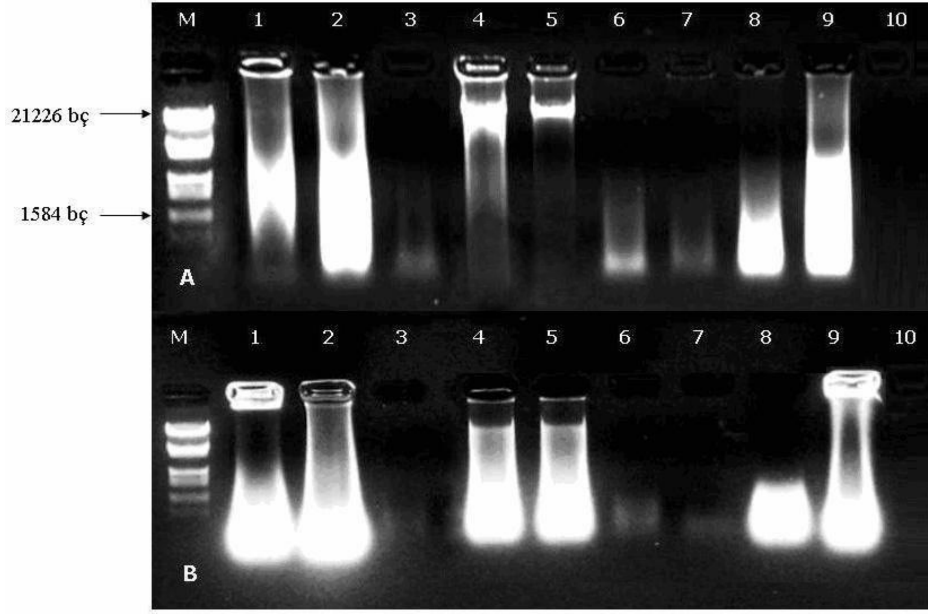
Sonuç olarak soya unu, soya kıyması, soya filizi, soya kahvesi, soya sütü, soya kreması ve tofu gıda örnekleri için DNA izolasyonu basamaklarındaki çeşitli modifikasyonlarla ürüne yönelik en uygun izolasyon prosedürü geliştirildi. Örneklere uygulanan modifikasyonların tamamı Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6: CTAB yöntemi ile DNA izolasyonunun ürüne göre optimizasyonu

	Un	Kıyma	Et	Tofu	Süt&Krema	Filiz	Kahve
Başlangıç miktarı (mg)	-	200	-	300	200	200	-
dH_2O (µl)	-	600	-	-	-	-	-
Ek kloroform aşaması	+	-	-	-	-	-	-
CTAB (µl)	-	-	-	-	-	1000	-
CTAB çöktürme tamponu	-	-	-	-	-	4 hacim	4 hacim
NaCl (µl)	500	-	-	-	-	-	-
İzopropanol	10 dk	-	-	-	20 dk	10 dk	-

'-' işareti izolasyon basamaklarında herhangi bir değişikliğin olmadığını göstermektedir.

Ticari kit ile yapılan izolasyon çalışmasında ise dokuz örneğin hepsinden başarılı bir biçimde DNA izole edildi. Örneklere ait agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1B'de verildi. İzole edilen DNA'ların miktarı, CTAB yöntemi ile izole edilen DNA'ların miktarından oldukça yüksek olmasına karşılık soya unu, soya kahvesi ve soya kremasında saflık sınırlarının dışında veriler elde edildi (Tablo 4.7). Her iki yöntemle yapılan izolasyon sonucu elde edilen DNA'ların miktarı, saflığı ve kalitesi gıda örneklerinin çeşidine ve işlenmişlik düzeyine göre farklılıklar gösterdi. Örneklerin işlenmişlik düzeyleri arttıkça elde edilen DNA'nın miktarının ve kalitesinin azaldığı gözlendi.



Şekil 4.1: Örneklerden izole edilen genomik DNA'ların (5µl) agaroz jel elektroforez görüntüsü. A: CTAB ile DNA izolasyon sonuçları B: Kit ile DNA izolasyon sonuçları 1) Soya unu; 2) Soya eti; 3) Soya kreması; 4) Soya filizi-1; 5) Soya filizi-2; 6) Soya sütü; 7) Soya kahvesi; 8) Tofu; 9) Soya kıyması; 10) İzolasyon kontrolü M) Markır (Fermentas, Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII)

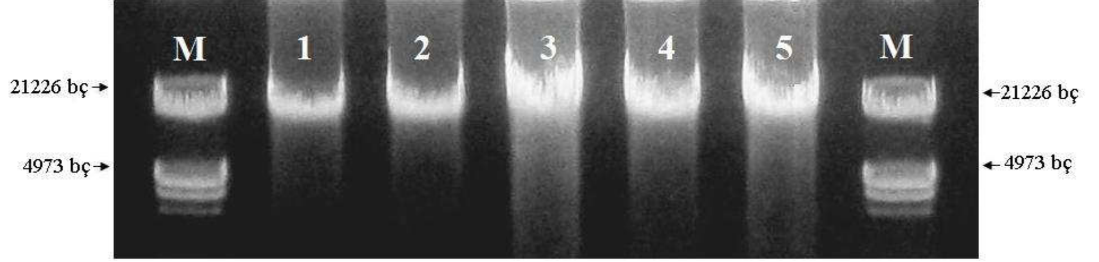
Örneklerin bazıları agaroz jelde bant görüntüsü vermedi, bazılarında ise sürüklenme görüntüsü elde edildi ancak spektrofotometrik ölçümlerde tüm örneklerde DNA varlığı belirlendi (Tablo 4.7). İşlem sırasında ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyon riski nedeniyle oluşabilecek hatalı pozitif sonuçları önlemek amacıyla uygulanan izolasyon kontrol grubunda herhangi bir bant gözlenmedi.

Tablo 4.7: CTAB ve ticari kit ile yapılan izolasyon sonucu genomik DNA'ların miktarları ve saflıkları

	CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu		**Kit ile DNA izolasyonu**	
Örnekler	**DNA miktarı**	**$A_{260/280}$**	**DNA miktarı**	**$A_{260/280}$**
Un	186 ng/µl	1.85	3019.1 ng/µl	1.67
Kıyma	337.2 ng/µl	1.97	663.3 ng/µl	1.81
Et	531.4 ng/µl	1.92	5841 ng/µl	1.94
Filiz-1	166.2 ng/µl	2.03	1224 ng/µl	1.75
Filiz-2	158.3 ng/µl	1.96	1112.7 ng/µl	1.81
Kahve	28.1 ng/µl	1.91	74.4 ng/µl	1.54
Krema	31.1 ng/µl	2.01	68.7 ng/µl	2.13
Süt	73 ng/µl	1.83	65.4 ng/µl	1.72
Tofu	155.3 ng/µl	1.95	681.4 ng/µl	1.79

Örneklerin yarısından fazlasının 100 ng/µl'nin üzerinde DNA içerdiği gözlendi. En düşük DNA konsantrasyonuna sahip örnek, CTAB yöntemi ile DNA izolasyon sonuçlarına göre 28.1 ng/µl ile soya kahvesi, kit ile izolasyon sonuçlarına göre ise 65.4 ng/µl ile soya sütü olarak belirlendi. En yüksek DNA konsantrasyonuna sahip örnek CTAB yöntemi ile DNA izolasyon sonuçlarına göre 531.4 ng/µl ile soya eti, kit ile izolasyon sonuçlarına göre ise 1224 ng/µl ile soya filizi-1 olarak belirlendi.

Çalışmanın bir sonraki aşaması olan kalitatif PCR analizlerinde kontrol grubu olarak, kantitatif 'real time' PCR analizinde ise standart eğri oluşturmak amacıyla kullanılacak olan SRM'lerden de başarılı bir şekilde CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: SRM'lerden izole edilen genomik DNA'ların (5µl) agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) % 0 SRM; 2) % 0.1 SRM; 3) % 0.5 SRM; 4) % 1 SRM; 5) % 2 SRM; M) Markır (Fermentas, Lambda DNA/*Eco*RI+*Hin*dIII)

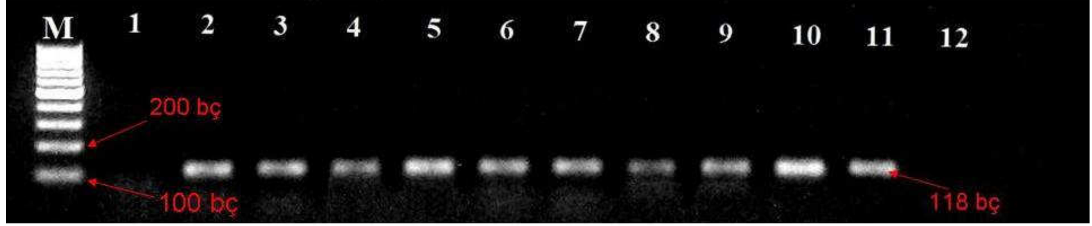
4.2. KALİTATİF PCR ANALİZLERİ İLE YABANCI GEN İÇEREN ÖRNEKLERİN SAPTANMASI

4.2.1. Lektin Geninin Kalitatif Olarak Saptanması

Örneklerden izole edilen DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen lektin genine özgü PCR sonucunda tüm örneklerin içerisinde soya DNA'sının var olduğu ve elde edilen DNA'ların PCR için yeterli kalitede olduğu saptandı. GMO3 ve GMO4 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda lektin geninin 118 bç'lik bölgesi başarıyla çoğaltıldı ve agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.3).

Mısırdan izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak lektin PCR'ının negatif kontrol grubu gerçekleştirildi ve bir bant izlenmedi. % 0 SRM ise PCR'ın pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı ve beklenen 118 bç'lik bant gözlendi. Kalıpsız kontrol

grubunda çoğalma gözlenmemesi (Şekil 4.3, 12 nolu örnek) kontaminasyonla ilgili bir riskin olmadığını gösterdi.



Şekil 4.3: GMO3/GMO4 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen lektin genine özgü PCR ürünlerinin (8 µl) agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) Mısır (negatif kontrol); 2) % 0 SRM (pozitif kontrol) 3) Soya unu; 4) Soya eti; 5) Soya kreması; 6) Soya sütü; 7) Soya filizi-1; 8) Soya filizi-2; 9) Soya kahvesi; 10) Tofu; 11) Soya kıyması; 12) Kalıpsız kontrol; M) Markır (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bç)

4.2.2. 35S Promotoru ve NOS Terminatörünün Kalitatif Olarak Saptanması

P35S-cf3/P35S-cr4 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR reaksiyonu sonucunda beş örnekte (tofu, kıyma, un, krema, süt) beklenen 123 bç'lik bölge çoğaltılabildi ve bu örneklerde 35S promotor dizisinin varlığı belirlendi (Şekil 4.5).

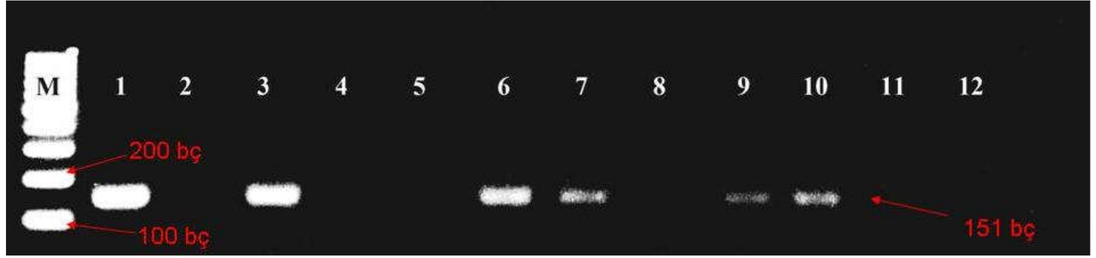
% 0 SRM'den izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak 35S promotoruna özgü PCR analizinin negatif kontrol grubu gerçekleştirildi ve bir bant izlenmedi. % 2 SRM ise PCR'ın pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı ve 123 bç'lik bant gözlendi. Kalıpsız kontrol grubunda çoğalma gözlenmemesi kontaminasyonla ilgili bir riskin olmadığını gösterdi.



Şekil 4.4: P35S-cf3/P35S-cr4 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen 35S promotoruna özgü PCR ürünlerinin (8 µl) agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) % 2 SRM (pozitif kontrol); 2) % 0 SRM (negatif kontrol); 3) Tofu; 4) Soya filizi-1; 5) Soya filizi-2; 6) Soya kıyması; 7) Soya unu; 8) Soya eti; 9) Soya kreması; 10) Soya sütü; 11) Soya kahvesi; 12) Kalıpsız kontrol; M) Markır (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bç)

NOS ter2-5′/NOS ter2-3′ primerleri kullanılarak gerçekleştirilen NOS terminatörüne özgü PCR sonucunda dokuz örnekten beşinde (tofu, kıyma, un, krema, süt) beklenen 151 bç'lik bölge çoğaltılabildi ve bu örneklerde NOS terminatör dizisinin varlığı belirlendi (Şekil 4.4).

% 0 SRM'den izole edilen DNA kalıp olarak kullanılarak NOS terminatörüne özgü PCR analizinin negatif kontrol grubu gerçekleştirildi ve bir bant izlenmedi. % 2 SRM ise PCR'ın pozitif kontrolü olarak kullanıldı ve 151 bç'lik bant gözlendi. Ayrıca kalıpsız kontrol grubunda çoğalma gözlenmemesi kontaminasyonla ilgili bir riskin olmadığını gösterdi.



Şekil 4.5: NOS ter2-5′/NOS ter2-3′ primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen NOS terminatörüne özgü PCR ürünlerinin (8 µl) agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1) % 2 SRM (pozitif kontrol); 2) % 0 SRM (negatif kontrol); 3) Tofu; 4) Soya filizi-1; 5) Soya filizi-2; 6) Soya kıyması; 7) Soya unu; 8) Soya eti; 9) Soya kreması; 10) Soya sütü; 11) Soya kahvesi; 12) Kalıpsız kontrol; M) Markır (Fermentas, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bç)

Başarılı bir şekilde DNA izole edilen tüm örneklerde lektin genine özgü PCR'ın pozitif sonuç vermesi, örneklerdeki soya içeriğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca transgen analizlerinden 35S promotoruna özgü PCR sonucunda 5/9 pozitif, NOS terminatörüne özgü PCR sonucunda ise yine 5/9 pozitif sonuç elde edilmiştir. Elde edilen tüm veriler Tablo 4.8'de özetlenmiştir.

Tablo 4.8: Kalitatif PCR analizlerinin sonuçları

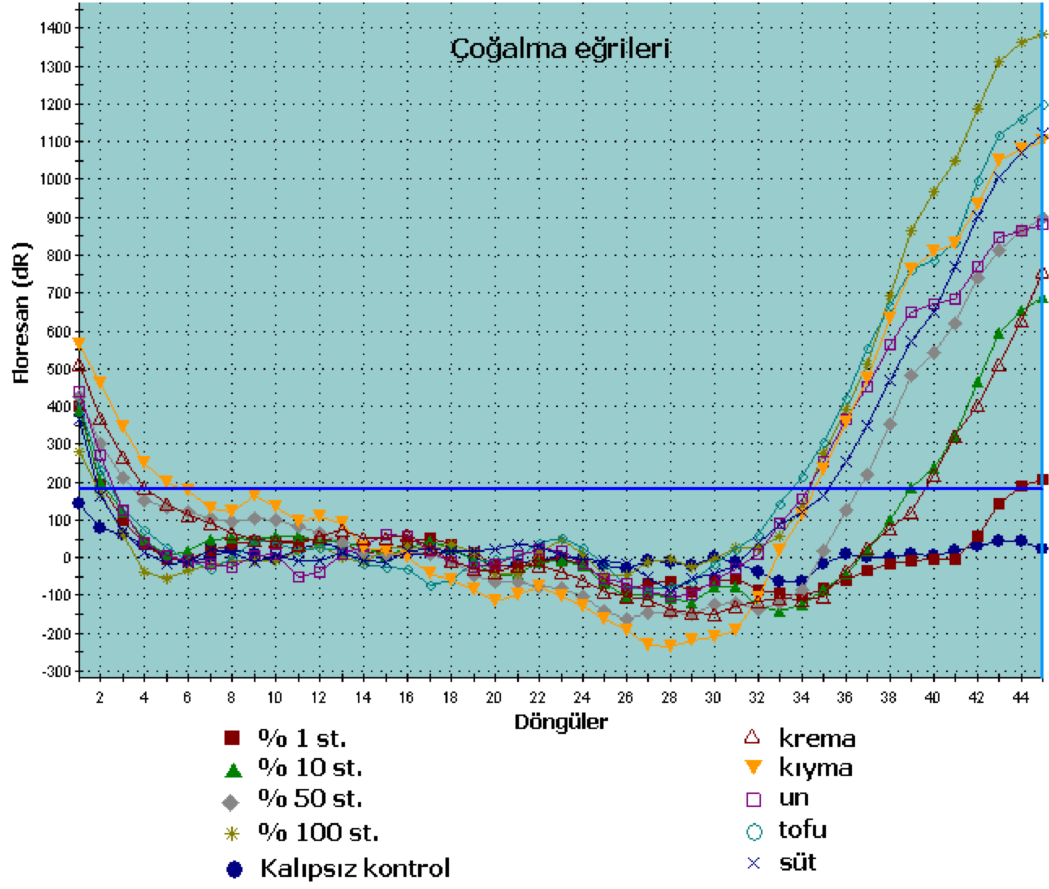
Örnekler	Lektin	NOS	35S	Pozitif kontrol	Negatif kontrol	Kalıpsız kontrol
Un	+	+	+	+	-	-
Kıyma	+	+	+	+	-	-
Et	+	-	-	+	-	-
Süt	+	+	+	+	-	-
Krema	+	+	+	+	-	-
Kahve	+	-	-	+	-	-
Filiz-1	+	-	-	+	-	-
Filiz-2	+	-	-	+	-	-
Tofu	+	+	+	+	-	-

4.3. ‘REAL TIME’ PCR ANALİZİ İLE TRANSGENE ÖZGÜ KANTİTASYON

Kalitatif PCR analizleri sonucunda hem 35S promotor hem de NOS terminatör bölgesini içeren beş örnek (un, kıyma, tofu, krema, süt) belirlendi. Bu verilere göre transgenik soya çeşitlerinden “RoundUp Ready” içerdiği muhtemel olan bu ürünlerde, CTP4-CP4 EPSPS bölgesine özgü primer ve prob seti kullanılarak yabancı gen oranı belirlendi. Örneklerdeki soya içeriklerini ölçmek için lektin genine özgü primer ve prob seti kullanıldı. Tüm ‘real time’ PCR analiz sonuçları Bölüm 3.5’te anlatıldığı gibi uygun standartlar kullanılarak oluşturulmuş standart eğrilerle değerlendirildi. İşlem, her bir örnek için çift tekrarlı gerçekleştirildi ve Ct değerleri ortalamaları alınarak değerlendirildi.

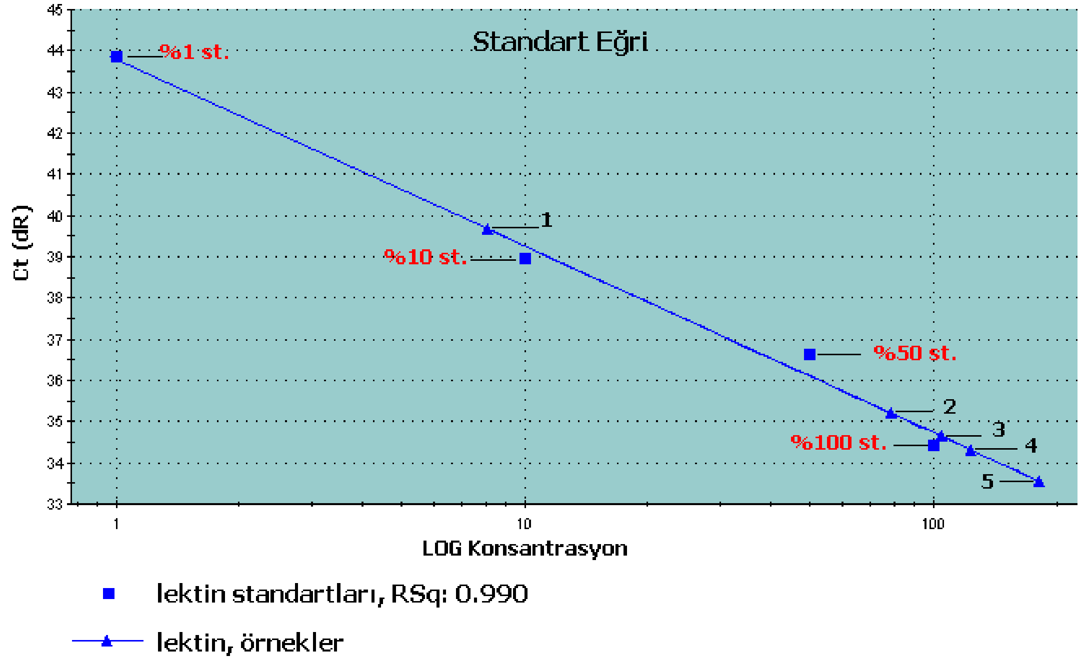
4.3.1. Lektin Geninin Kantitatif Olarak Saptanması

Lektin genine özgü ‘real time’ PCR analiziyle ürünlerin içerisindeki toplam soya oranı belirlendi. Tüm örneklerin ve standartların ışıma miktarı (dR), eşik değer çizgisini geçerek anlamlı bir Ct değeri verdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Lektin genine ait 'real time' PCR çoğaltım grafiği.

Lektin geninin miktarının belirlenmesi için %1, 10, 50, 100 soya DNA'sı içeren standartlar kullanılarak oluşturulan standart eğri referans alınarak örneklerin içerdiği lektin geni oranları belirlendi (Şekil 4.7). İçerdikleri lektin miktarı (yüzde olarak) bilinen standartların vermiş olduğu Ct değerlerinden yararlanılarak, analiz edilen örneğin Ct değerinden yola çıkıp içerdiği lektin yüzdesi hesaplandı.

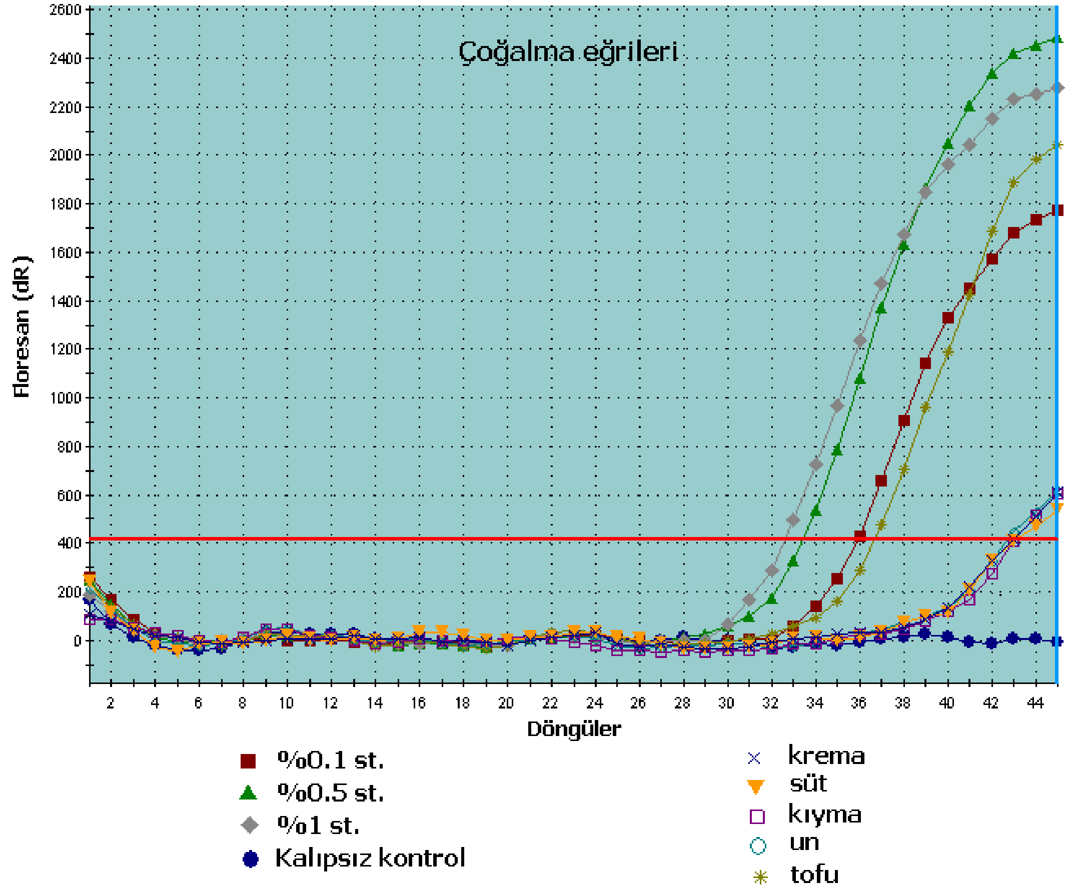


Şekil 4.7: Lektin genine ait 'real time' PCR'ının standart eğri grafiği.
1) Soya kreması; 2) Soya sütü; 3) Soya kıyması; 4) Soya unu; 5) Tofu

Lektin standart eğrisinin RSq (doğrusal korelasyon katsayısı) değerinin beklenildiği gibi 1'e yakın (0.990) olması, yapılan 'real time' PCR analizinin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Kalıpsız kontrolde çoğalma gözlenmemesi kontaminasyonla ilgili bir risk olmadığını kanıtlamaktadır.

4.3.2. CTP4-CP4 EPSPS Bölgesinin Kantitatif Olarak Saptanması

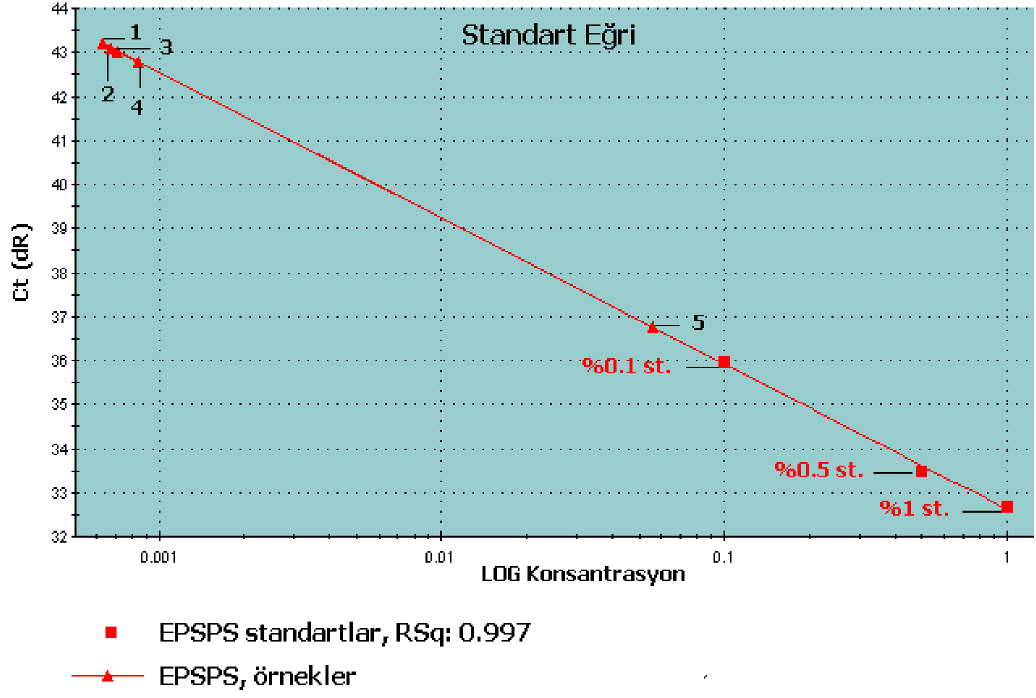
CTP4-CP4 EPSPS bölgesine özgü 'real time' PCR analizi ile ürünlerin içeriğinde bulunan yabancı gen oranı belirlendi. Tüm örneklerin ve standartların ışıma miktarı (dR), eşik değer çizgisini geçerek anlamlı bir Ct değeri verdi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: CTP4-CP4 EPSPS bölgesine ait ‘real time’ PCR çoğaltım grafiği.

Transgene özgü olan bu bölgenin miktarının belirlenmesi için % 0.1, 0.5, 1 GDO içeren standartlar kullanılarak oluşturulan standart eğri referans alınarak örneklerin içerdiği yabancı gen oranları belirlendi (Şekil 4.9). İçerdikleri GD DNA miktarı (yüzde olarak) bilinen standartların vermiş olduğu Ct değerlerinden yararlanılarak analiz edilen örneğin Ct değerinden içerdiği GD DNA yüzdesi hesaplandı.

CTP4-CP4 EPSPS standart eğrisinin RSq (doğrusal korelasyon katsayısı) değerinin beklenildiği gibi 1’e yakın (0.997) olması, yapılan ‘real time’ PCR analizinin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Kalıpsız kontrolde çoğalma gözlenmemesi kontaminasyonla ilgili bir risk olmadığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.9: CTP4-CP4 EPSPS bölgesine ait 'real time' PCR'ının standart eğri grafiği. 1) Soya sütü; 2) Soya kıyması; 3) Soya kreması; 4) Soya unu; 5) Tofu

Buna göre, kalitatif ve kantitatif PCR'lar sonucu transgenik soya çeşitlerinden "RoundUp Ready" içerdiği belirlenen gıda örneklerinden tofunun %0.05, unun %0.00084, kıymanın %0.00067, sütün %0.00063, kremanın %0.0007 oranında yabancı gen içerdiği belirlendi. CTP4-CP4 EPSPS 'real time' PCR'ına ait sonuçlar Tablo 4.9'da özetlendi.

Tablo 4.9: CTP4-CP4 EPSPS bölgesine özgü primer ve prob setiyle gerçekleştirilen 'real time' PCR analizinin sonuçları

Örnek no.	Örnek adı	Örnek tipi	Ct	Miktar (%)
1	Kalıpsız kontrol	NTC	-	-
2	%0.1 st.	Standart	35.95	0.1
3	%0.5 st.	Standart	33.49	0.5
4	%1 st.	Standart	32.68	1
5	Tofu	Bilinmeyen	36.75	0.05
6	Un	Bilinmeyen	42.78	0.00084
7	Kıyma	Bilinmeyen	43.10	0.00067
8	Süt	Bilinmeyen	43.19	0.00063
9	Krema	Bilinmeyen	43.02	0.0007

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genetiği değiştirilmiş gıdaların dünya marketlerine girmesiyle bu ürünlerin kullanımının giderek yaygınlaşması, insan sağlığı ve çevre üzerindeki olası olumsuz etkileri konusundaki endişeleri de beraberinde getirmiştir. Bu nedenle, üretim aşamalarının sıkı bir şekilde incelenip risk değerlendirmelerinin yapılmasına ve tüketicilerin bilinçli tercih yapabilmeleri için etiketlendirilmeleri ile ilgili düzenlemelerin oluşturulmasına gerek duyulmuştur.

Avrupa Birliği, tüketicilerin bilinçli tercih yapmasını sağlamak için ürünün % 0.9'un üzerinde bir değerde GDO içermesi durumunda etiketlendirilmesini zorunlu tutmaktadır. Son yıllarda ülkemizde de bu konuda yeni düzenlemeler yapılmıştır. 26 Mart 2010 tarihli, 27533 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Biyogüvenlik Kanunuyla birlikte transgenik bitkilerin yetiştirilmesi engellenmiştir, ancak genetik değişim içeren gıda maddeleri ithalat yolu ile ülkemize girebilir ve çeşitli denetimlerden geçerek marketlerimize sunulabilir. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bilimsel Komite tarafından değerlendirilmiş ve kullanım alanları belirlenmiş transgenik çeşitleri, Avrupa Birliği'nin yasal düzenlemelerine benzer olarak % 0.9'un üzerinde içeren ürünlerin etiketlenmesi zorunlu hale getirilmiştir. Bu değerin altındaki oranların ise önlenemeyecek kontaminasyonlardan kaynaklanabileceği kabul edilmiştir.

Bu yasal düzenlemeler, sınırlamalara uygun, bilimsel esaslara dayalı, güvenilir ve onaylı belirleme/ölçüm tekniklerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu amaç doğrultusunda, transgen dizisinin çoğaltılması esasına dayanan PCR tekniği veya transgen ürününü belirlemeye yönelik immünolojik yöntemler kullanılmaktadır. Avrupa Birliği referans laboratuvarı (EURL-GMFF) tarafından GDO analizinde kullanılmak üzere onaylanmış bir yöntem olan PCR (Van Den Eede, 2011), günümüzde işlenmiş veya işlenmemiş ürünlerin rutin analizinde de yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, DNA temelli yöntemler kullanılarak hem Türkiye'de üretilen hem de yurtdışından ithal edilip marketlerimizde piyasaya sunulan işlenmiş soya ürünlerinden, kalitatif analizler sonucu "RoundUp Ready" transgenik çeşidini içermesi muhtemel olan örneklere kasete özgü kantitasyon analizi uygulanarak transgen ve ürünün içerdiği transgen miktarı belirlendi.

GDO analizinin ilk ve en önemli basamağı olan DNA izolasyonu, CTAB yöntemi ve ticari kit olmak üzere iki şekilde gerçekleştirildi. Bu iki yöntemin işlenmiş gıdalar üzerindeki etkinlikleri incelendi. Kit ile izolasyon sonuçlarına göre elde edilen DNA'lar miktar bakımından yüksek ancak özellikle un, kahve ve krema örneklerinde saflık bakımından düşük sonuçlar verdi. CTAB ile DNA izolasyon yönteminde, kite göre daha düşük ancak PCR analizi için yeterli miktarda, saf DNA'lar elde edildi. Buna göre, CTAB ile DNA izolasyon yönteminin işlenmiş gıdalar için daha uygun olduğu sonucuna varıldı. Ticari kitlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek işlenmişlik seviyelerine sahip gıdalar için en iyi sonucun CTAB yöntemiyle alındığı literatürde de yer almaktadır. Marmiroli ve diğ.'nin 2008' de yapmış olduğu çalışmada on üç farklı izolasyon yöntemi, izole edilen DNA'nın miktarına, inhibitörlerin varlığına, yöntemin maliyetine ve harcanan zamana bağlı olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, bu tez çalışmasındaki verilere paralel olarak en etkin DNA izolasyon yönteminin CTAB olduğunu göstermiştir. Yine 2008 yılında Mafra ve diğ.'nin işlenmişlik seviyeleri farklı, soya kökenli çeşitli gıda ürünlerinde yapmış olduğu karşılaştırmalı DNA ekstraksiyon çalışmasında üçü ticari kit ve biri CTAB yöntemi olmak üzere dört farklı prosedür kullanılmıştır. Çalışmada soya unu, soya protein izolatı, soya içeceği, soya sosu ve soya ve/veya tofu içeren vejeteryan gıda ürünleri gibi işlenmişlikleri ve içerikleri farklı gruplar seçilmiştir. Sonuç olarak daha az kırık ve buna bağlı olarak kolaylıkla çoğaltılabilen DNA'nın izole edildiği CTAB yöntemi, çalışmadaki tüm gıda matrikslerinde de en iyi sonucu vermiştir.

CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen DNA izolasyonları sonucunda, elde edilen DNA'ların kalitesinin ve miktarının gıda türüne ve işlenmişlik düzeyine bağlı olarak değiştiği gözlendi. Soya sütü veya soya kreması gibi süt ürünlerine uygulanan

izolasyon basamakları sonucu spektrofotometrik ölçümlerde DNA varlığı belirlendi ancak jel elektroforezinde bant gözlenmedi. Bu durumun, üretim sırasındaki öğütme ve kaynatma aşamalarından dolayı DNA'nın büyük kısmının kaybedilmesi sonucu örnekten çok düşük miktarda DNA'nın izole edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Soya sütü üretimi sırasında bir gece suda bekletilen soya tohumları öğütülür ve filtre edilir. Son olarak filtre edilmiş sıvı soya sütü elde etmek üzere kaynatılır. Kharazmi ve diğ. (2003)'e göre, süt üretimindeki ıslatılmış soya tohumlarının öğütülmesi, sıcaklık uygulamasından daha kritik bir DNA parçalanma aşamasıdır. Ogasawara ve diğ. (2003) soya sütü, tofu ve okara üretimi sırasındaki kaynatma aşamasının DNA degredasyonuna etkisini araştırmak üzere hedef alınan 595 bç'lik bir bölgenin işlem sonrasında da hala varolduğunu bildirilmiştir. Tofu örneğinde ise soya sütü ve soya kremasına göre daha yüksek konsantrasyonda DNA elde edilmiştir. Kaynatma işlemi sırasında kimyasal uygulanması DNA yıkımını arttırmasına rağmen tofu üretiminde kullanılan soya sütündeki proteinlerin asit ve tuz çöktürmesinden sonra daha fazla DNA yıkımı belirlenmemiştir. Soya sütünde varlığı saptanan 595 bç'lik hedef bölge tofuda da gözlemlenmiştir.

Soya kahvesinden 28.1 ng/µl DNA izole edildi. Bu miktar CTAB ile DNA izolasyon sonuçlarına göre en düşük konsantrasyondaki DNA'nın izole edilebildiği gıda türünü işaret etmektedir. Bu durumun ise, soya tohumlarının uzun süre yüksek sıcaklıklarda kavrularak soya kahvesi haline getirildiği üretim aşamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yine Ogasawara ve diğ. (2003), kavurma işleminin soya üzerindeki etkisini incelemiş ve sonuç olarak kavrulan soyalarda 595 bç'lik bölgeyi çoğaltmak mümkün olmuştur fakat kahve gibi hem toz kıvamında öğütülüp hem kavrulan soyalarda sadece 195 bç'lik bir bölge başarıyla çoğaltılabilmiştir. Buna karşılık, soya filizi gibi işlenmemiş ürünler ise DNA'nın kaybedilmesine ya da yapısının bozulmasına neden olacak işlemlere maruz kalmamaktadır. Bu nedenle agaroz jelde diğer işlenmiş ürünlerdeki gibi sürüklenme görüntüsü alınmayan tek ürün çeşidi soya filizi oldu.

Soya unu örneğinde ise konsantrasyon bakımından daha verimli fakat düşük saflıkta DNA'lar elde edildi. USDA raporlarında 1 ons yani 28.35 g soya ununun 7 g yağ (doymuş+doymamış), 10 g protein ve 10 g karbonhidrat içeriğine sahip olduğu

bildirilmiştir. İzolasyon sonucuna göre soya unundan elde edilen DNA'nın safsızlığının, yüksek orandaki bu bileşenlerin tamamının işlem sırasında uzaklaştırılamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kolesterol içermeyen yapısı ve sahip olduğu yüksek protein içeriği nedeniyle hayvansal proteine alternatif bir besin maddesi olan soya eti ve soya kıyması, soya ununun yağı uzaklaştırılarak granül haline getirilmesiyle elde edilir. Taski-Ajdukovic ve diğ. (2009)'nin işlenmiş et ürünlerinde genetik değişimin belirlenmesi üzerine yapmış oldukları çalışmada belirtildiği üzere yoğun olarak bulunan proteinlerin su bağlama özelliğinden dolayı soya kıyması genelde emülgatör olarak kullanılmaktadır. Bu bilgi doğrultusunda CTAB prosedürünün birinci basamağında eklenen 300 µl dH_2O iki katına çıkarılarak soya kıymasından başarılı bir şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında gıda yapısındaki ve işlenmişliklerindeki farklılıklar göz önünde bulundurularak izolasyon basamaklarında çeşitli modifikasyonlar yapılarak ürüne yönelik en uygun izolasyon prosedürü ortaya konuldu.

Bu tez çalışmasında kullanılan modifiye edilmiş CTAB ile DNA izolasyon yöntemi, soya kahvesi ve soya kreması gibi DNA verimi az olan örneklerde (soya kahvesi 28.1 ng/µl, soya kreması 31.1 ng/µl) bile, daha sonra PCR'la GDO analizi yapılması için saflık ve miktar bakımından güvenilir sonuçlar vermiştir. GD Gıda ve Yem için Avrupa Birliği Referans laboratuvarı (EURL-GMFF), mısır ve soya gibi pek çok gıda türü için CTAB metodunun uygulanabilirliğini onaylamıştır (CRL-GMFF, 2007, 2008). Carderelli ve diğ. (2005)'nin, farklı işlenmişlik seviyelerine sahip soya ve mısır içeren yetmiş sekiz örnekte "RoundUp Ready" soya, Bt 176 ve MON 810 mısır çeşitlerini belirlemek üzere yapmış oldukları PCR analizleriyle yabancı gen taraması çalışmasında bütün DNA izolasyonları CTAB yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Randhawa ve diğ. (2010) ise *Bacillus thuringiensis*'in delta endotoksinlerini kodlayan Bt pamuk çeşitlerinden MON15985 ve MON531'i belirlemeye yönelik yapmış oldukları çalışmada 5-6 haftalık filizlerin yapraklarından yine CTAB yöntemi ile DNA izole etmiştir.

Yukarıda bahsedilen soya ürünlerinde, yabancı genlerin varlığı, Avrupa Birliği tarafından onaylanmış pek çok transgenik üründe bulunan düzenleyici diziler olan CaMV 35S promotor ve NOS terminatör dizilerinin kalitatif PCR analizleriyle araştırıldı. Nitekim birçok çalışmada da transgenik ürünlerin belirlenmesi için bu diziler kullanılmıştır (Berdal ve Holst-Jensen, 2001; Carderelli ve diğ., 2005; Ujhelyi ve diğ., 2008; Randhawa ve diğ., 2010). Günümüzde ekimi yapılan transgenik ticari soya çeşitlerinden "RoundUp Ready", yaygın olarak kullanılan bu iki diziyi birlikte içermektedir. 35S dizisinin varlığının belirlenmesine yönelik yapılan kalitatif PCR analizi sonucunda soya unu, soya kıyması, soya sütü, soya kreması ve tofu olmak üzere dokuz örnekten beşinde 35S promotor dizisinin varlığı belirlendi. NOS dizisinin varlığının belirlenmesine yönelik yapılan PCR analizi sonucunda ise soya unu, soya kıyması, soya sütü, soya kreması ve tofu olmak üzere dokuz örnekten yine beşinde NOS terminatör dizisinin varlığı belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda toplam dokuz örnekten beşinin GD ürün içerdiği ve bu beş ürünün tamamının "RoundUp Ready" olma ihtimali belirlendi.

Kalitatif PCR analizleri sonucu her iki düzenleyici dizi bakımından pozitif sonuç veren örneklerin kantitatif analizleri 'real time' PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. Çok düşük miktarda DNA içeriğini bile belirleyebilecek kadar hassas olan bu yöntem, GDO analizi için güvenilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Kuribara ve diğ. (2002) MON 810, Bt176, Bt11, T25, GA21 olmak üzere beş transgenik mısır ve "RoundUp Ready" transgenik soya çeşidi için 'real time' PCR tekniğine dayalı kantitasyon yöntemini başarılı bir şekilde uygulamıştır. Ülkemizde GDO analizlerinin yanı sıra et tür tayini, gıda maddelerinde soya aranması ve gıda patojenlerinin belirlenmesi gibi analizlerde de 'real time' PCR yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

Kalitatif PCR analizleri sonucunda hem 35S hem de NOS bölgelerini taşıdığı belirlenen, transgenik soya çeşitlerinden "RoundUp Ready" içermesi muhtemel olan örneklere kasete özgü bir dizi olan CTP4-CP4 EPSPS bölgesi hedef alınarak 'real time' PCR uygulandı. Bu iki düzenleyici diziyi bir arada bulunduran başka bir ticari transgenik soya çeşidi bulunmamasına rağmen, doğrudan transgenin sinyal peptidi ile birleştiği bölge hedef alınarak aktarılan gen kaseti belirlendi. Bu analiz sonucu

aktarılan gen kasetinin belirlenmesi, GDO analizinde en az miktar sınırlandırmaları kadar önemli olan onaylı olmayan GD çeşitlerin piyasada olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. “RoundUp Ready” çeşidinin gen kasetinde bulunan CTP4-CP4 EPSPS bölgesininin beş örnekte (soya unu, soya kıyması, soya sütü, soya kreması ve tofu) de çoğaltılabilmesi, bu örneklerin “RoundUp Ready” olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Piyasadaki transgenik soyaların yaklaşık % 90’ını oluşturan “RoundUp Ready” yıllardır en yaygın çeşit olarak bilinmektedir (James, 2011). GD olduğu belirlenen beş gıdanın tamamında “RoundUp Ready” çeşidinin varolduğunun saptanması piyasada bulunan GD gıdaların çoğunun aynı çeşide ait olduğunu doğrulamaktadır. Transgen analizinin haricinde kantitatif analizlerin esas amacı transgen oranını belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda elde edilen sonuçlar “RoundUp Ready” olduğu belirlenen gıda örneklerinden tofunun % 0.05, unun %0.00084, kıymanın % 0.00067, sütün % 0.00063, kremanın % 0.0007 oranında yabancı gen içerdiği belirlendi. Yapılan analizler sonucu belirlenen oranların etiketleme eşik değeri olan % 0.9’un altında olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular, yakın zamanda yürürlüğe girmiş olan Biyogüvenlik Kanunu gereği ülkemizde GDO’ların izlenmesi ve etiketlenmesiyle ilgili denetimler hakkında fikir verebilecek niteliktedir. İleriki çalışmalarda, GTS 40-3-2 (RoundUp Ready)’nin yanı sıra A2704-12 ve MON89788 transgenik soya çeşitlerinin kasete özgü ve/veya çeşide özgü (“event specific”) PCR analizleri yapılarak tarama çerçevesi genişletilebilir.

KAYNAKLAR

AHMED, F.E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods, *Trends in Biotechnology*, 20 (5), 215-223.

ALISSON, L.A., 2007, *Recombinant DNA Technology*, Fundamental Molecular Biology, Blackwell Publishing, USA, 180-230.

ANONİM 2012a, *Glycine max* (L.) Merr. Taxonomic Hierarchy [online], Itis Report http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26716 [Ziyaret Tarihi: 18.03.2012].

ARI, Ş., 2004, *Doğrudan Gen Anlatım Teknikleri*, Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed.), Bitki Biyoteknolojisi, Bölüm 16, S.Ü. Basımevi, Konya, Türkiye, 160-189.

BERDAL, K.G., HOLST-JENSEN, A., 2001, RoundUp Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis, *European Food Research and Thechnology*, 213, 432-438.

BİLİM, SANAYİ ve TEKNOLOJİ BAKANLIĞI, Soya Raporu 2010, http://tgm.sanayi.gov.tr/DocumentList.aspx?catID=1061&lng=tr [Ziyaret Tarihi: 11.11.2011].

BRADY, C.J., MC GLASSON, W.B., PEARSON, J.A., MELDRUM, S.K., KOPELIOVITCH, E., 1985, Interactions between amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit, *Journal of American Society for Horticultural Science*, 110 (2), 254-258.

BROOKES, G., BARFOOT, P., 2009, *GM Crops: Global Socio-economic and Environmental Impacts 1996-2007*, P.G. Economics Ltd, Dorchester, UK, 1-109.

BUDD, R., 1991, Biotechnology in the 20th century, *Social Studies of Science*, 21 (3), 415-457.

CARDARELLI, P., BRANQUINHO, M., FERREIRA, R., CRUZ, F, GEMAL, A.L., 2005, Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience, *Food Control*, 859-866.

CARTAGENA BİYOGÜVENLİK PROTOKOLÜ, 2000, Montreal.

CHILTON, M.D., DRUMMOND, M.H., MERIO, D.J., SCIAKY, D., MONTOYA, A.L., GORDON, M.P., NESTER, E.W., 1977, Stable incorporation of plasmid DNA

into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis, *Cell*, 11, 263-271.

CHILTON, M.D., SAIKI, R.K., YADAV, N., GORDON, M.P., QUETIER, F., 1980, T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (7), 4060-4064.

CHRISPEELS, M.J., RAIKHELB, N.V., 1991, Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense, *The Plant Cell*, 3, 1-9.

CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed), 2007, Maize seeds sampling and DNA extraction- Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds, http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoss.htm [Ziyaret Tarihi: 10.02.2012].

CRL-GMFF (Community Reference Laboratory for GM Food and Feed), 2008, Report on the validation of a DNA extraction method from soybean seeds, http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/summaries/MON89788_Soya_DNAExtrSampl_report .pdf [Ziyaret Tarihi: 10.02.2012].

ÇETİNER, S., BUDAK, H., 2007, *Genetiği değiştirilmiş (transgenik) ürünlerin moleküler analizi ve tüketim zincirindeki izlenebilirliğine yönelik tekniklerin geliştirilmesi ve uygulanması*, TÜBİTAK projesi, proje no: 1050072.

DAVISON, J., 2010, GM plants: Science, politics and EC regulations, *Plant Science*, 178, 94-98.

ELENIS, D.S., KALOGIANNI, D.P., GLYNOU, K., IOANNOU, P.C., CHRISTOPOULOS, T.K., 2008, Advance in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 347-354.

EUROPEAN COMMISSION, 2003, EC No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed, *Official Journal of the European Union*, 268, 1-23.

EUROPEAN COMMISSION, 2003, EC No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC, *Official Journal of the European Union*, 268, 24-28.

FRIEDMAN, M., BRANDON, D.L., 2001, Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1069-1086.

GASPARIC, M.B., TENGS, T., LA PAZ, J.L., HOLST-JENSEN, A., PLA, M., ESTEVE, T., ZEL, J., GRUDEN, K., 2010, Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2023-2029.

GLICK, B.R., PASTERNAK, J.J., PATTEN, C.L., 2010, *Recombinant DNA technology*, Molecular Biotechnology: Principles and Aplications of Recombinant DNA, Chapter 3, ASM Pres, USA, 49-92.

GMDD: a database of GMO detection methods, GMO Detection Laboratory in Shanghai Jiao Tong University, http://gmdd.shgmo.org/primer/list, [Ziyaret Tarihi: 20.10.2011].

GRYSON, N., 2010, Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2003-2022.

GUPTA, M., RAM, R., 2004, *Development of Genetically Modified Agronomic Crops*, The GMO handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

HAN, L., 2004, *Genetically Modified Microorganisms*, Parekh S.R. (ed.), The GMO handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1-59259-801-3.

HERMANN, K.M., 1995, The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds, *The Plant Cell*, 7, 907-919.

HOBSON, G.E., 1965, The ripening of tomato fruit as affected by the enjection of certain chemicals, *Journal of Experimental Botany*, 16 (3), 411-422.

HOLST-JENSEN, A., RONNING, S.B., LOVSETH, A., BERDAL, K.G., 2003, PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 985-993.

HOLST-JENSEN, A., 2009, Testing for genetically modified organisms: Past, present and future perspectives, *Biotechnology Advances*, 27, 1071-1082.

HOUDEBINE, L.M., 2009, Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 107-121.

ISAAA, GM Approval Database, Soybean (*Glycine max* L.) events, http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/cropevents/default.asp?CropID=18, [Ziyaret Tarihi: 02.04.2012].

JAMES, C., 2011, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA Brief No. 43, ISAAA, Ithaca, New York.

KHARAZMI, M., BAUER, T., HAMMES, W.P., HERTEL, C., 2003, Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*, *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (4), 495–501.

KORTH, K.L. (2008) *Genes and traits of interest for transgenic plants*. In: C. Neal Stewart, Jr., (ed.), Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications, Chapter 8, Wiley and Sons, New York, 193-215.

KRAMER, M.G., REDENBAUGH K., 1994, Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR^{TM} tomato story, *Euphytica*, 79 (3), 293-297.

KURIBARA, H., SHINDO, Y., MATSUOKA, T., TAKUBO, K., FUTO, S., AOKI, N., HIRAO, T., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYADA, M., HINO A., 2002, Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, *Journal of AOAC International*, 85 (5), 1077-1089.

LAURA, B., PETRA, H., SIMON, K., GUY V.E., 2001, *Review of GMO detection and quantification techniques*, European Commission Joint Research Centre, Ispra.

MAFRA, I., SILVA, A.S., MOREIRA, E., FERREIRA DA SILVA, S.C., BEATRIZ, M., OLIVEIRA, P.P., 2008, Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products, *Food Control*, 19, 1183-1190.

MANIATIS, T., FRITCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratuary manual*, Cold spring harbor laboratory press, NY.

MARMIROLI, N., MAESTRI, E., GULLI, M., MALCEVSCHI, A., PEANO, C., BORDONI, R., DE BELLIS G., 2008, Methods for detection of GMOs in food and feed, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 369-384.

MICHELINI, E., PATRIZIA, S., CEVENINI, L., MEZZANOTTE L., RODA, A., 2008, New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 355-367.

MOCELLIN, S., ROSSI, C.R., PILATI, P., NITTI, D., MARINCOLA, F.M., 2003, Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research, *Trends in Molecular Medicine*, 189-195.

MONSANTO COMPANY, 2000, Updated Molecular Characterization and safety assessment of RoundUp Ready Soybean Event 40-3-2, *Monsanto Report*, Product Safety Centre.

MURRAY, H.G., THOMPSON, W.F., 1980, Rapid extraction of high molecular weight DNA, *Nucleic Acids Research*, 8 (19), 4321-4325.

OGASAWARA, T., ARAKAWA, F., AKIYAMA, H., GODA, Y., OZEKI, Y., 2003, Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans, *Japanese Journal of Food Chemistry*, 10 (3), 155–160.

ÖKTEM, H.A. (2004) *Herbisitlere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi*. Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed.), Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Bölüm 17, S.Ü. Basımevi, Konya, Türkiye, 190-202.

ÖKTEM, H.A. (2004) *Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi*. Özcan S., Gürel E. ve Babaoğlu, M. (ed.), Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Bölüm 18, S.Ü. Basımevi, Konya, Türkiye, 208-226.

ÖZTÜRK, D., 2011, *Mısır Kökenli Gıdalarda Yabancı Gen Taraması*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

PADGETTE, S.R., KOLACZ, K.H., DELANNAY, X., Re, D.B., LA VALLEE, B.J., TINIUS, C.N., RHODES, W.K., OTERO, Y.I., BARRY G.F., EICHOLTZ, D.A., PERCKHE, V.M., NIDA, D.L., TAYLOR, N.B., KISHORE, G.M., 1995, Development, identification and characterization of glyphosate-tolerant soybean line, *Crop Science*, 35, 1451-1461.

PAREKH, S.R., GREGG, A., 2004, *Introduction*, Parekh S.R. (ed.), The GMO handbook: Genetically modified animals, microbes and plants in biotechnology, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1-59259-801-3.

PHILIP, R., DARNOWSKI, D.W., SUNDARARAMAN, V., CHO, M.J., VODKIN, L.O., 1998, Localization of β-glucuronidase in protein bodies of transgenic tobacco seed by fusion to an amino terminal sequence of the soybean lectin gene, *Plant Science*, 137, 191-204.

QUERCI, M., MAZZARA, M. (2006) *Characteristics of RoundUp Ready Soybean, MON810 maize and Bt-176 maize*. In: Querci M. ve diğ. (ed.), The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, Session 7, European Communities, Luxemburg.

RANDHAWA, G.J., CHHABRA, R., SINGH, M., 2010, Decaplex and Real-Time PCR Based Detection of MON531 and MON15985 Bt Cotton Events, *Journal of AOAC International,* 58, 9875-9881.

RESMİ GAZETE, 2009, Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelik.

RESMİ GAZETE, 2010, Gıda ve Yem Amaçlı Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerin İthalatı, İşlenmesi, İhracatı, Kontrol ve Denetimine Dair Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik.

RESMİ GAZETE, 2010, Biyogüvenlik Kanunu, Kanun no: 5977.

SCHMUTZ, J., CANNON, S.B., SCHLUETER J., MA, J., MITROS, T., NELSON, W., HYTEN, D.L., SONG, O., THELEN, J.J., CHENG, J., XU, D., HELLSTEN,

U., MAY, G.D., YU, Y., SAKURAI, T., UMEZAWA, T., BHATTACHARYYA, M.K., SANDHU, D., VALLIYODAN, B., LINDQUIST, E., PETO, M., GRANT, D., SHU, S., GOODSTEIN, D., BARRY, K., FUTRELL-GRIGGS, M., ABERNATHY, B., DU, J., TIAN, Z., ZHU, L., GILL, N., JOSHI, T., LIBAULT, M., SETHURAMAN, A., ZHANG, X., SHINOZAKİ, K., NGUYEN, H.T., WING, R.A., CREGAN, P., SPECHT, J., GRIMWOOD, J., ROKHSAR, D., STACEY, G., SHOEMAKER, R.C., JACKSON, S.A., 2010, Genome sequence of the palaeopolyploid soybean, *Nature*, 463, 178-183.

SHEEHY, R.E., PEARSON, J., BRADY, C.J., HIATT, W.R., 1987, Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase, *Molecular and General Genetics*, 280 (1-2), 30-36.

SOMMA, M. (2006) *Extraction and Purification of DNA*, QUERCI M. ve diğ. (ed.), Training course on: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms User Manual, Session 4, European Communities, Luxemburg.

SOMMA, M., QUERCI, M. (2010) *Polimeraz Zincir Reaksiyonu*, , Querci M. ve diğ. (ed.), Gıda Örneklerinde Genetiği Değiştirilmiş Organizma Analizleri Kurs El Kitabı, Bölüm 6, Avrupa Birliği, Luxemburg.

TAN, S., EVANS, R., SINGH, B., 2006, Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops, *Amino acids*, 30, 195-204.

TASKI-AJDUKOVIC, K., NIKOLIC, Z., VUJAKOVI, M., MILOSEVIC, M., IGNJATOV, M., PETROVIC, D., 2009, Detection of genetically modified organisms in processed meat products on the Serbian food market, *Meat Science*, 81, 230-232.

TERRY, C.F., HARRIS, N., PARKERS, H. C., 2002, Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction, *Journal of AOAC International*, 85, 768–774.

TRAPMANN, S., SCHIMMEL, H., KRAMER, G.N., VAN DEN EEDE, G., PAUWELS, J., 2002, Production of CRMs for the detection of genetically modified organisms, *Journal of AOAC International,* 85 (3), 775-9.

TZFIRA, T., CITOVSKY, V., 2006, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology, *Plant Biotechnology*, 17, 147-154.

UJHELYI, G., VAJDA, B., BE´KI, E., NESZLE´NYI, K., JAKAB, J., JA´NOSI, A., NE´MEDI, E., GELENCSE´R, E., 2008, Surveying the RR soy content of commercially available food products in Hungary, *Food Control*, 976-973.

UNITED NATIONS, 2007, World Urbanization Prospects: The 2007 Revision Population Database, Department of Economic and Social Affairs: Population Division, New York.

USDA, National Nutrient Database for Standart Reference, Release 24, http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4799?fg=&man=&lfacet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=SOYBEAN [Ziyaret Tarihi: 05.03.2012].

VAN DEN EEDE, G., 2011, JRC reference reports, *Compendium of reference methods for GMO analysis*, Italy.

WILLMITZER, L., DE BEUCKELEER, M., LEMMERS, M., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1980, DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells, *Nature*, 287, 359-361.

WINDELS, P., TAVERNIES, I., DEPICKER, A., VAN BOCKSTAELE, E., DE LOOSE, M., 2001, Characterization of RoundUp Ready soybean insert, *European Food Research and Technology*, 213, 107-112.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul'da doğdum. Liseyi 2004 yılında Etiler Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2009 yılında lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başladım.